

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006728

International filing date: 30 March 2005 (30.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-107746  
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 3 1 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 1 0 7 7 4 6

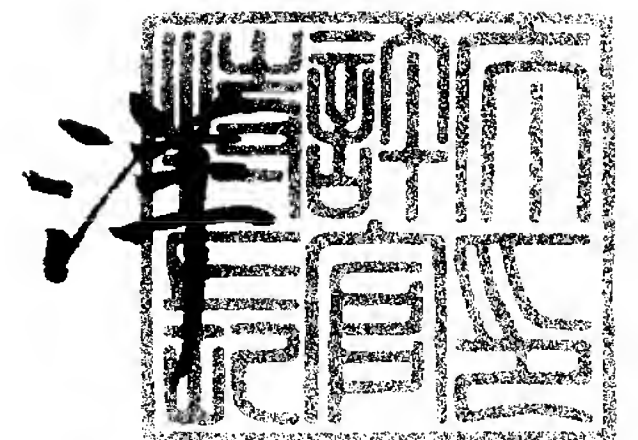
パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号  
J P 2 0 0 4 - 1 0 7 7 4 6  
The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

出 願 人  
Applicant(s): アンジェスM G 株式会社

2 0 0 5 年 4 月 2 0 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】	特許願
【整理番号】	P2004-2
【特記事項】	特許法第36条の2第1項の規定による特許出願
【あて先】	特許庁長官殿
【国際特許分類】	G01N 33/68
【発明者】	
【住所又は居所】	神戸市垂水区端ヶ丘5-19
【氏名】	里 直行
【発明者】	
【住所又は居所】	京都府京都市伏見区竹田内畑町229
【氏名】	大河内 正康
【発明者】	
【住所又は居所】	吹田市山田東4-1-1-406
【氏名】	谷山 義明
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府箕面市箕面8-4-16
【氏名】	荻原 俊男
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府吹田市千里山西1-41-4
【氏名】	森下 竜一
【特許出願人】	
【識別番号】	500409323
【氏名又は名称】	アンジェス エムジー株式会社
【代表者】	山田 英
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	184182
【納付金額】	35,000円
【提出物件の目録】	
【物件名】	外国語特許請求の範囲 1
【物件名】	外国語明細書 1
【物件名】	外国語図面 1
【物件名】	外国語要約書 1

【書類名】 外国語特許請求の範囲

What we claim is:

1. A method for identifying a pharmaceutical candidate which is capable to remove peptide, oligopeptide, polypeptide or protein from fibril or aggregate, comprising measuring soluble peptide, oligopeptide, polypeptide or protein concentration in medium at equilibrium in the presence of test compound.
2. The method of claim 1 wherein the pharmaceutical candidate is used for treatment of a disease caused by aggregation of peptide, oligopeptide, polypeptide or protein.
3. The method in claim 1 or 2 wherein the disease is selected from Alzheimer('s) disease (AD), Parkinson's disease (PD)、Huntington's chorea or prion disease.
4. The method in any claim of 1 to 3, wherein the fibril or aggregate was formed in vitro.
5. The method in any claim of 1 to 4, wherein the equilibrium has come under ultrasound irradiation.
6. The method in any claim of 1 to 5, wherein the ultrasound irradiation accompanies no heat generation substantially.
7. The method in any claim of 1 to 6, wherein the ultrasound irradiation condition is 1MHz, 2W/cm<sup>2</sup>, duty ratio 20%, repetition of 30 seconds irradiation followed 10 seconds break for 5 times.
8. A method for identifying a pharmaceutical candidate which is capable to remove beta-amyloid (A $\beta$ ) from fibril or aggregate comprising measuring soluble A $\beta$  concentration in medium at equilibrium in the presence of test compound, wherein the fibril is aggregated in vitro.
9. The method of claim 8, wherein the fibril or aggregate is comprising from A $\beta$  (1-40).
10. The method of claim 8, wherein the fibril or aggregate is comprising from A $\beta$  (1-42).
11. The method in any claim of 8 to 10, wherein the equilibrium has come under ultrasound irradiation.
12. The method in any claim of 8 to 11, wherein the ultrasound irradiation accompanies no heat generation substantially.
13. The method in any claim of 8 to 12, wherein the ultrasound irradiation condition is 1MHz, 2W/cm<sup>2</sup>, duty ratio 20%, repetition of 30 seconds irradiation followed 10 seconds break for 5 times.
14. A method for treatment of a disease caused by aggregation of peptide, oligopeptide, polypeptide or protein, comprising ultrasound irradiation to a patient.
15. The method of claim 14 wherein the disease is selected from Alzheimer('s) disease (AD), Parkinson's disease (PD)、Huntington's chorea or prion disease.

## 【書類名】 外国語明細書

### 1. Title of the Invention

Assay method for identifying pharmaceutical candidate

### 2. Detailed Explanation of the Invention

#### Background of the invention

Senile plaques containing  $A\beta$  are one of the pathological features of Alzheimer's disease.

The reduction of  $A\beta$  is considered a primary therapeutic target.

Amyloid clearance by anti- $A\beta$  antibodies has been reported after immunization.

Recent data have shown that the antibodies may act as a peripheral sink for  $A\beta$  thus altering the periphery/brain dynamics.

The fact that senile plaques disappear means that aggregation process of  $A\beta$  is reversible.

As yet, however, there has been no evidence that soluble  $A\beta$  is eluted from aggregated  $A\beta$ .

Here we develop in vitro  $A\beta$  sink-like elution assay analyzing supernatant replaced following centrifuge of  $A\beta$  fibrils and show that soluble  $A\beta$  was eluted from aggregated  $A\beta$ . Moreover, ultrasound facilitates  $A\beta$  elution.

A compound that enhance  $A\beta$  elution in this in vitro  $A\beta$  sink-like elution assay or ultrasound may a possible therapeutic option for Alzheimer's disease.

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by the presence of senile plaques in the brain.

$A\beta$ , a 40-42 amino acid peptide, is the primary component of senile plaques.

Familial forms of the disease have been linked to mutations in the amyloid precursor protein (APP) and the presenilin genes.

Disease-linked mutations in these genes result in increased production of  $A\beta$  42, which is the predominant form found in the senile plaques.

Recently, immunization of mutant APP transgenemice with  $A\beta$  was shown to effectively at prevent plaque deposition (Schenk, Barbour et al. 1999).

Moreover, both plaques and neuritic lesions are reversible after administration of a single dose of  $A\beta$  antibody (Lombardo, Stern et al. 2003).

In addition to  $A\beta$  antibody, peripheral treatment with an agent that has high affinity for  $A\beta$  (gelsolin or GM1) reduced the level of  $A\beta$  in the brain (Matsuoka, Saito et al. 2003).

It is proposed that generation of peripheral sink mechanism via administration of antibodies may be useful for treating a number of disorders characterized by a bnormal protein accumulation in the extracellular space (DeMattos, Bales et al. 2001).

In vitro,  $A\beta$  aggregation process has been well studied.

However, the reverse phenomenon,  $A\beta$  elution from aggregated  $A\beta$  has not yet been studied.

To study  $A\beta$  elution from aggregated  $A\beta$  in this study we developed a novel in vitro  $A\beta$  sink-like elution assay.

Here we show that soluble  $A\beta$  was eluted from aggregated  $A\beta$ .

Moreover, ultrasound facilitates  $A\beta$  elution.

A compound that enhance  $A\beta$  elution in this in vitro  $A\beta$  sink-like elution assay and/or ultrasound may a possible therapeutic option for Alzheimer's disease.

W094/10569 disclosed a method for diagnosing or monitoring a P-amyloid peptide (PAP)-related condition in a patient, said method comprising: measuring the amount of soluble pAP or pAP fragments in a patient sample; comparing the measured amount with a predetermined amount of PAP or PAP fragments; and assessing patient status based on a difference between the measured and predetermined PAP or PAP fragment amounts. (claim 23)

W000/26238 disclosed a method of identifying an agent which is capable of preventing, reducing and/or reversing the conversion of a prion protein to a  $\beta$ -form, the method comprising: providing a sample of a prion protein and comparing the amount of the  $\beta$ -form quantitatively or qualitatively in the presence and absence of a test agent. (claim 50)

W000/43791 disclosed a method comprising: forming a solution containing a species capable of binding neurodegenerative disease aggregate-forming or fibril-forming species and one of a sample suspected of containing neurodegenerative disease aggregate-forming or fibril-forming species for a candidate drug for inhibition of neurodegeneration wherein the article is a self-suspendable particle. (claim 172)

However, these prior arts are not easy, not quick, not reliable or not inexpensive method to evaluate a lot of test compounds.

### Best mode for the invention

#### Examples

The present invention is further illustrated by the following examples, but not limited thereto.

#### (1) METHODS

##### 1) Chemicals and Solvents

Chemicals were obtained from Sigma and Wako, unless described especially.

Water was double-distilled and deionized using a Milli-Q system (Millipore Corp, Bedford, MA).

##### Peptides

A $\beta$  (1-40) and A $\beta$  (1-42) were obtained from Peptide Institute (Osaka, Japan).

A $\beta$  solution was freshly prepared every each experiment as described (Hartley, Walsh et al. 1999).

0.55 mg A $\beta$  (1-40) peptide was dissolved in 130  $\mu$ l 1 mM NaOH containing 0.01 % phenol red.

10 mM NaOH was added to adjust pH to 7.5.

PBS/ddH<sub>2</sub>O was added to obtain 500  $\mu$ M A $\beta$  solution.

For removing remaining unsolved A $\beta$ , we performed centrifugation (15,000  $\times$  g, 3 min) before supernatant was aliquoted.

##### 2) Sample Preparation

20  $\mu$ l of 500  $\mu$ M A $\beta$  solution was aliquoted to 1.5 ml eppendorf tube.

Samples were incubated at 37  $^{\circ}$ C for various periods until fibrillogenesis was completed.

Following centrifugation (15,000  $\times$  g, 10 min) at 22  $^{\circ}$ C, the supernatant was removed.

The resulting pellet (i.e. A $\beta$  fibril) was washed with PBS three times.

20  $\mu$ l of fresh PBS was added onto the pellet slowly and carefully. The Samples were incubated at 37 °C for 1 day. Following centrifugation (15,000  $\times$  g, 10 min) at 22 °C, 16  $\mu$ l of the supernatant was collected and further analyzed. The remaining supernatant was removed. 20  $\mu$ l of fresh PBS was added onto the pellet slowly and carefully. These procedure was repeated (Fig. 1). Samples were analyzed by ELISA, Western Blotting, Mass Spectrometry, SEC as described below.

### 3) Sandwich A $\beta$ ELISA

Sandwich ELISA for A $\beta$  (1-40) and A $\beta$  (1-42) was performed using A $\beta$  (1-40) ELISA Kit and A $\beta$  (1-42) ELISA Kit, respectively (Biosource).

### 4) SEC

Superose 6 (Amersham) column was attached to HPLC system consist of a injector, and a UV detector.

Column was eluted at a flow rate of 0.04 ml/min and peptides were detected by UV absorbance at 218 nm.

Each experiment was performed at least two times. Pre-packed columns were washed with 2N NaOH between experiments.

For each study, the appropriate column was equilibrated with at least three column volumes of elution buffer and then calibrated with five molecular weight standards: avian ovalbumin (44,000); equine myoglobin (17,000); human  $\gamma$ -globulins (158,000); bovine thyroglobulin (670,000); and vitamin B12 (1,350).

Elution Buffer used was 75 mM NaCl, 5 mM Tris-HCl (pH 7.4).

### 5) Gel Electrophoresis and Western Blotting

SDS-PAGE was carried out on Tris/Tricine gel (Invitrogen).

Samples were mixed with 2 $\times$  SDS sample buffer (Invitrogen) and boiled for 5 min immediately prior to electrophoresis.

The samples were transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, Bedford, MA, USA).

Western blotting was performed using 6E10 antibody.

ECL was used as detection system.

### 6) Mass Spectrometry

Combined immunoprecipitation/MALDI-TOF MS (IP/MS) analysis of A $\beta$  species was performed as described (Okochi, Steiner et al. 2002).

### 7) Ultrasound

Sample tubes were treated with ultrasound for 30 sec (2.5W/cm<sup>2</sup>) at room temperature (repeated 5 times for 30 sec irradiation).

## (2) RESULTS

Soluble A $\beta$  was eluted from aggregated A $\beta$ .

A. sandwich ELISA for eluted A $\beta$  (1-40) and A $\beta$  (1-42).

Sandwich ELISA for eluted A $\beta$  (1-40) and A $\beta$  (1-42) was performed as described in experimental procedure.

The quantity of eluted A $\beta$  (1-40) was  $6562.5 \pm 1750.9$  (S.E.) pg/ml (n=6).



The quantity of eluted A $\beta$  (1-42) was  $1939.7 \pm 607.6$  (S.E.) pg/ml (n=6).

B. Mass spectrometry of eluted A $\beta$  (1-40) and A $\beta$  (1-42).

Mass spectrometry analysis confirmed Molecular weight of eluted A $\beta$  (1-40) and A $\beta$  (1-40) is 4329.8 and 4514.0, respectively.

D. SEC analysis of eluted A $\beta$  (1-40) and A $\beta$  (1-42).

SEC analysis showed abundant single 2.4 ml peak.

Ultrasound facilitates A $\beta$  elution.

Sample tubes were treated with ultrasound for 30 sec ( $2.5\text{W}/\text{cm}^2$ ) with duty ratio 20 % at room temperature (repeated 5 times for 30 sec irradiation).

Sandwich ELISA for eluted A $\beta$  (1-40) and A $\beta$  (1-42) was performed.

Ultrasound for 30 sec ( $2.5\text{W}/\text{cm}^2$ ) with duty ratio 20 % at room temperature (repeated 5 times for 30 sec irradiation) facilitated A $\beta$  (1-40) elution (control:  $8791.7 \pm 3121.1$  (S.E.) pg/ml (n=3); ultrasound:  $49479.3 \pm 2167.6$  (S.E.) pg/ml (n=3); p less than 0.001).

Alternative protocol (30 sec ( $2.5\text{W}/\text{cm}^2$ ) with duty ratio 50 % at room temperature (repeated 2 times for 30 sec irradiation) also enhanced A $\beta$  (1-40) elution (control:  $8791.7 \pm 3121.1$  (S.E.) pg/ml (n=3); ultrasound 50 %  $\times$  2 times:  $35520 \pm 7140$  (S.E.) pg/ml (n=3); p less than 0.05).

SEC analysis of fibrogenesis and oligomerization of A $\beta$  (1-42).

Immediately after dissolution, soluble A $\beta$  (1-42) was chromatographed on a Superose 6 as described under Experimental procedures.

The gel-included peak elutes at 1.9 ml.

We cannot determine the size of the A $\beta$  oligomer in this peak.

Oligomer protofibril was observed between 1h and 12h.

The peak at 2.4m rose at 5h time point.

This peak was eluted in the same fraction as the peak observed when eluted A $\beta$  (1-40) was analyzed in SEC.

## REFERENCES

1. DeMattos, R. B., K. R. Bales, et al. (2001).

"Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease."

Proc Natl Acad Sci U S A 98(15): 8850-5.

2. Hartley, D. M., D. M. Walsh, et al. (1999).

"Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons."

J Neurosci 19(20): 8876-84.

3. Lombardo, J. A., E. A. Stern, et al. (2003).

"Amyloid-beta antibody treatment leads to rapid normalization of plaque-induced neuritic alterations."

J Neurosci 23(34): 10879-83.

4. Matsuoka, Y., M. Saito, et al. (2003).

"Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to beta-amyloid."

J Neurosci 23(1): 29-33.

5. Okochi, M., H. Steiner, et al. (2002).



"Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1."

Embo J 21(20): 5408-16.

6. Schenk, D., R. Barbour, et al. (1999).

"Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse."

Nature 400(6740): 173-7.

#### 4. Brief Explanation of the Drawings

Fig. 1 Experimental Procedure of in vitro A $\beta$  sink-like elution assay

20  $\mu$ l of 500  $\mu$ M A $\beta$  solution was aliquoted to 1.5 ml eppendorf tube.

Samples were incubated at 37  $^{\circ}$ C for various periods until fibrillogenesis was completed.

Following centrifugation (15,000  $\times$  g, 10 min) at 22  $^{\circ}$ C, the supernatant was removed.

The resulting pellet (i.e. A $\beta$  fibril) was washed with PBS three times. 20  $\mu$ l of fresh PBS was added onto the pellet slowly and carefully.

The Samples were incubated at 37  $^{\circ}$ C for 1 day.

Following centrifugation (15,000  $\times$  g, 10 min) at 22  $^{\circ}$ C, 16  $\mu$ l of the supernatant was collected and further analyzed.

The remaining supernatant was removed.

20  $\mu$ l of fresh PBS was added onto the pellet slowly and carefully.

This procedure was repeated.

Samples were analyzed by ELISA, Western Blotting, Mass Spectrometry, SEC.

Fig. 2 Soluble A $\beta$  was eluted from aggregated A $\beta$ .

A. sandwich ELISA for eluted A $\beta$  (1-40) and A $\beta$  (1-42).

Sandwich ELISA for eluted A $\beta$  (1-40) and A $\beta$  (1-42) was performed as described in experimental procedure.

B. Mass spectrometry of eluted A $\beta$  (1-40) and A $\beta$  (1-42).

C. Western Blotting Analysis of eluted A $\beta$  (1-40).

D. SEC analysis of eluted A $\beta$  (1-40).

Fig. 3 Ultrasound facilitates A $\beta$  elution.

A. Experimental Procedure of ultrasound

B. sandwich ELISA for eluted A $\beta$  (1-40).

Fig. 4 SEC analysis of fibrogenesis and oligomerization of A $\beta$  (1-42).

Fig. 5 Schematic representation of in vitro A $\beta$  sink-like elution assay

【配列表】

【配列表】

<110> Naoyuki Sato  
<160> NUMBER OF SEQ ID NOS: 2  
<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 40  
<212> Peptide  
<213> Homo Sapiens  
<223> OTHER INFORMATION: A $\beta$ 40  
<400> SEQUENCE: 1  
DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV 40

<210> 2  
<211> 42  
<212> Peptide  
<213> Homo Sapiens  
<223> OTHER INFORMATION: A $\beta$ 42  
<400> SEQUENCE: 2  
DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV IA 42

Figure 1

in vitro Aβ sink-like elution assay

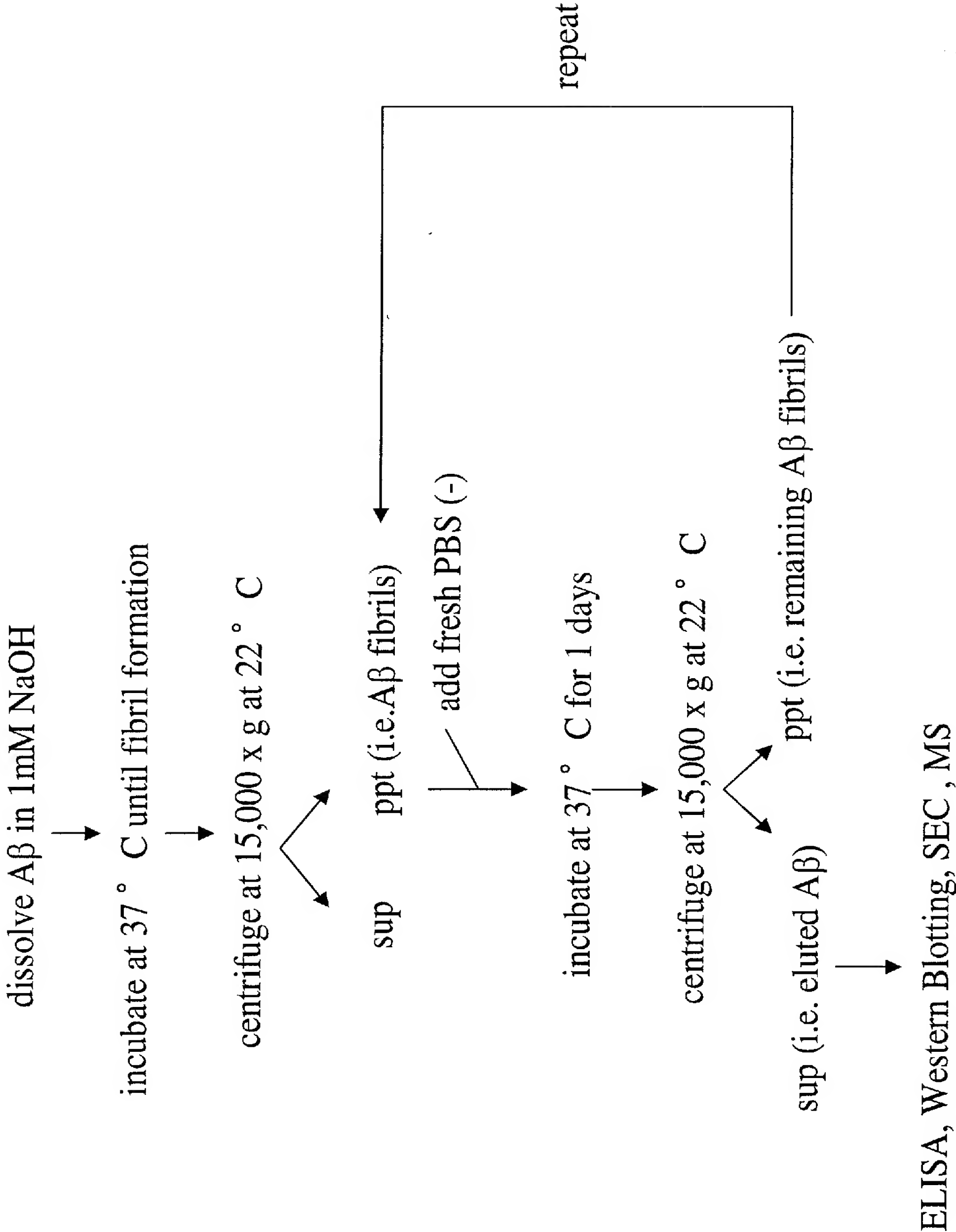
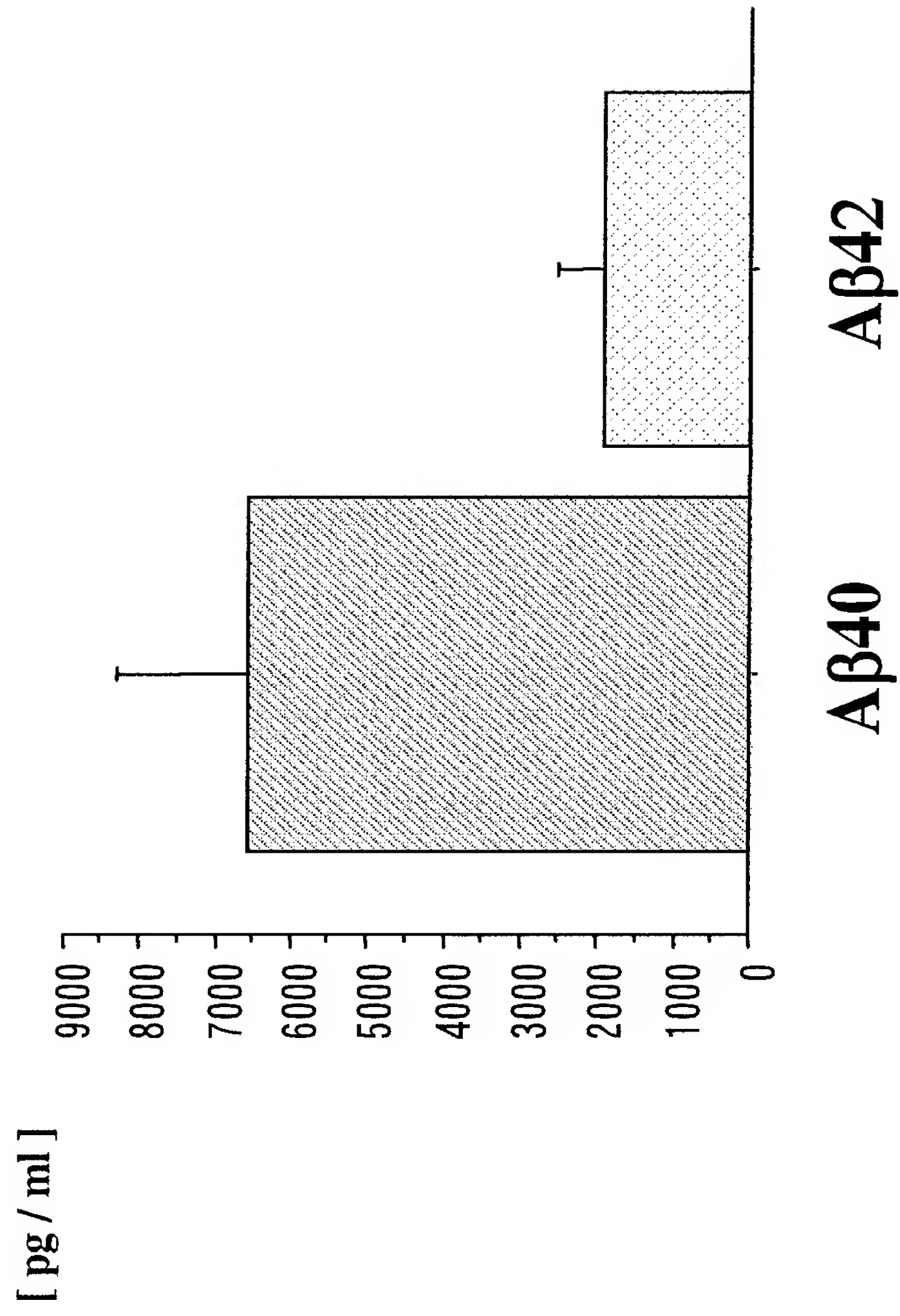


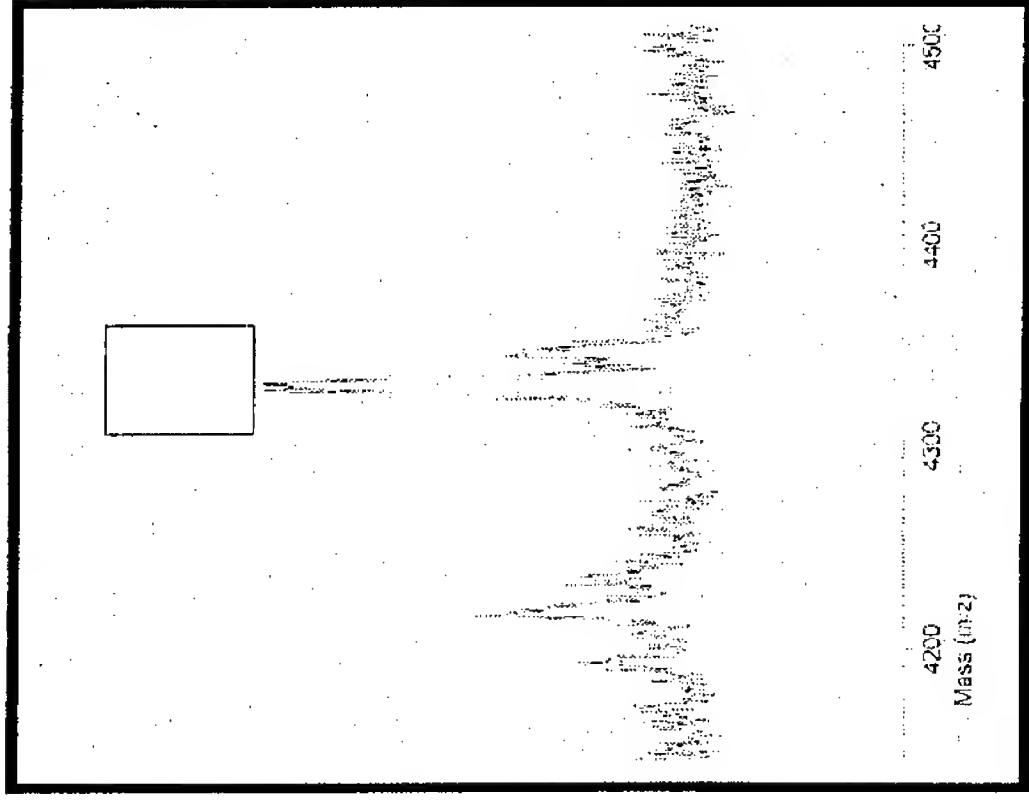
Figure 2

A

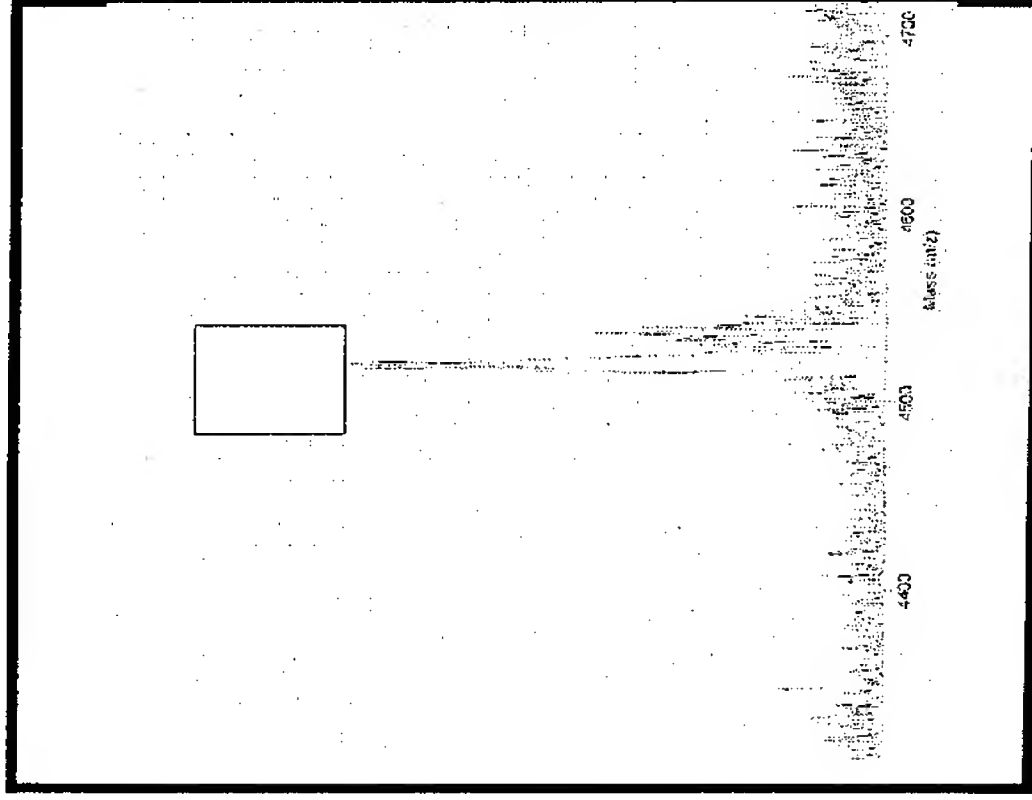


**B**

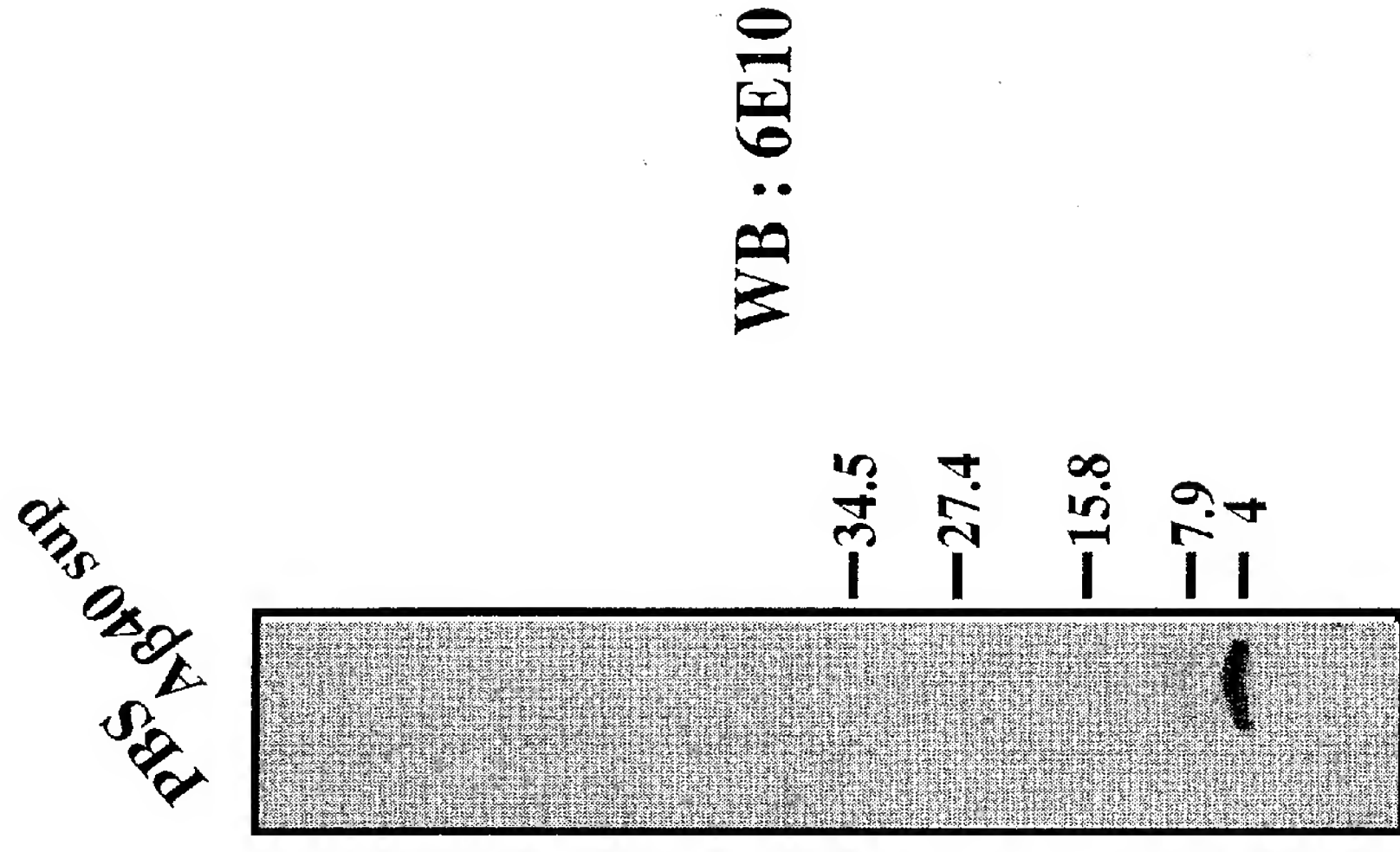
**A $\beta$ 40**



**A $\beta$ 42**



**C**



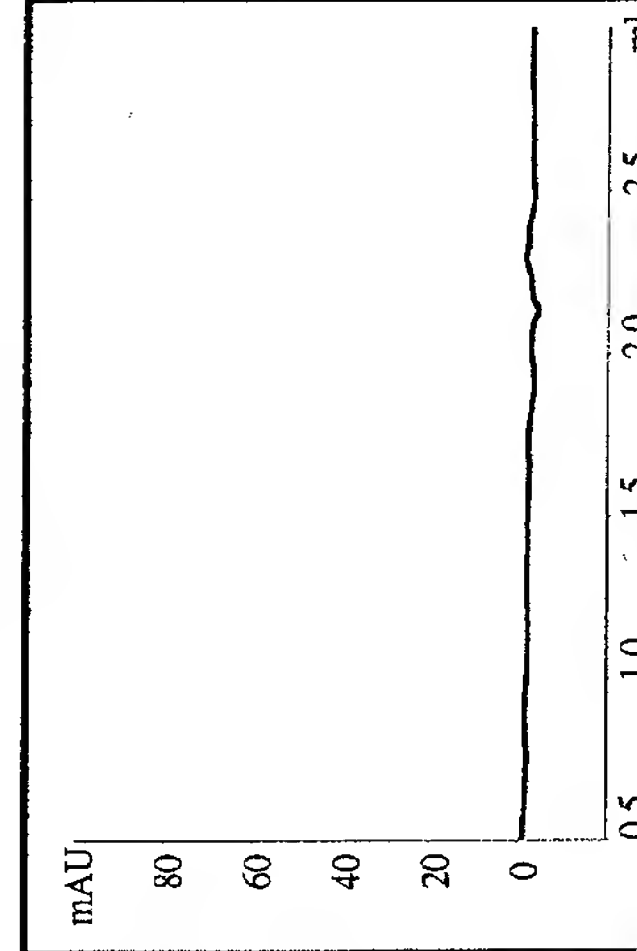
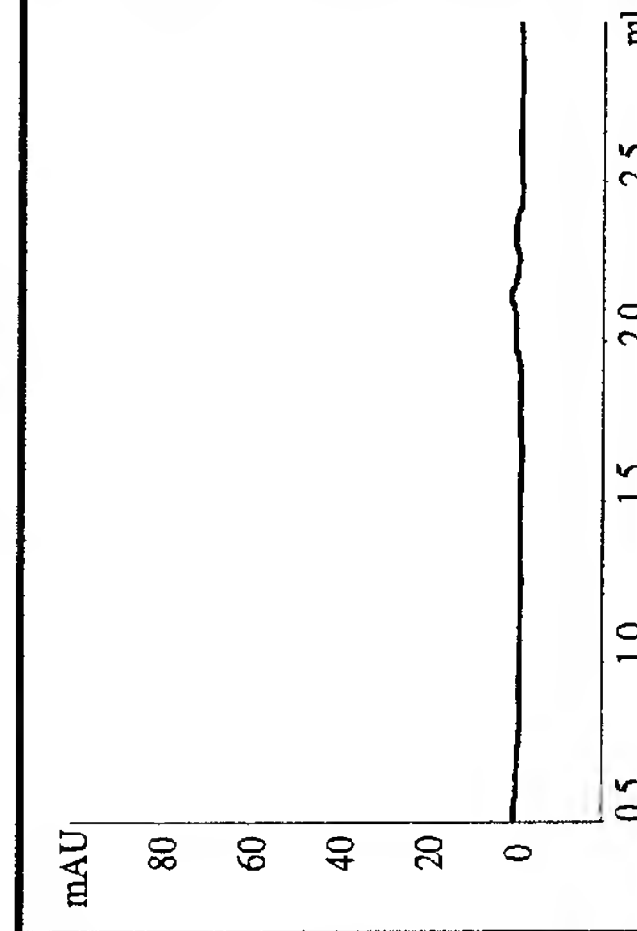
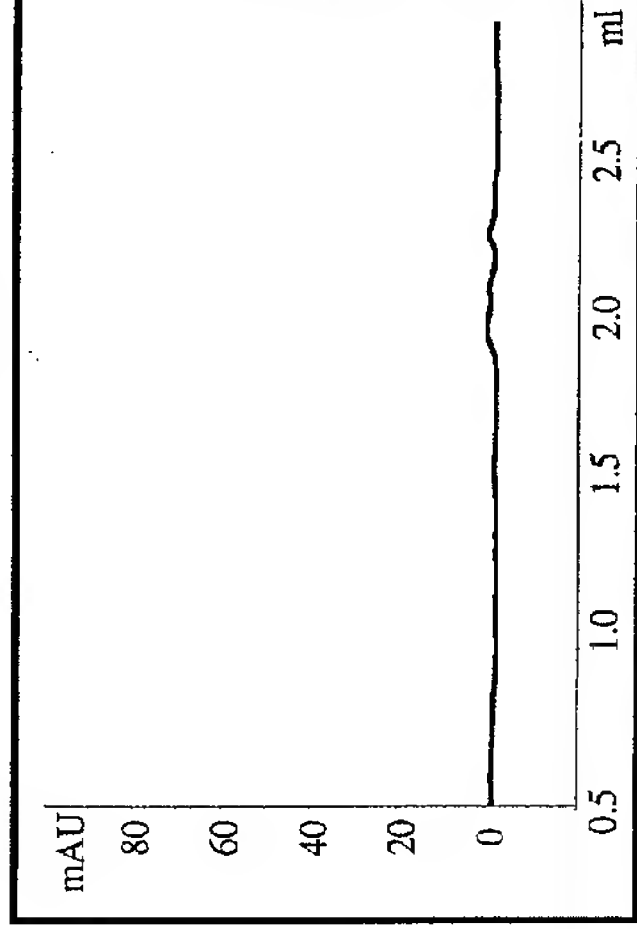
E

6th day

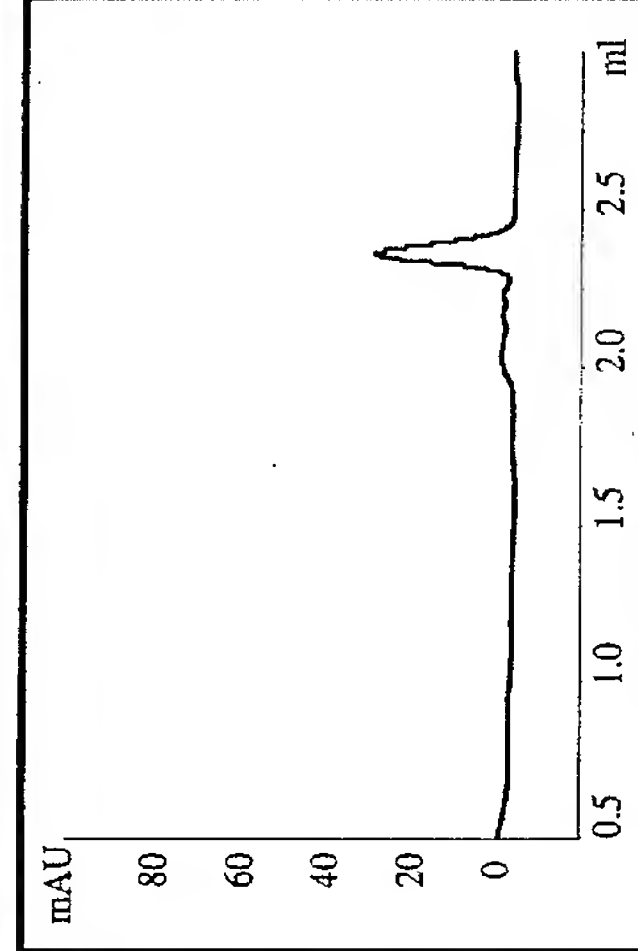
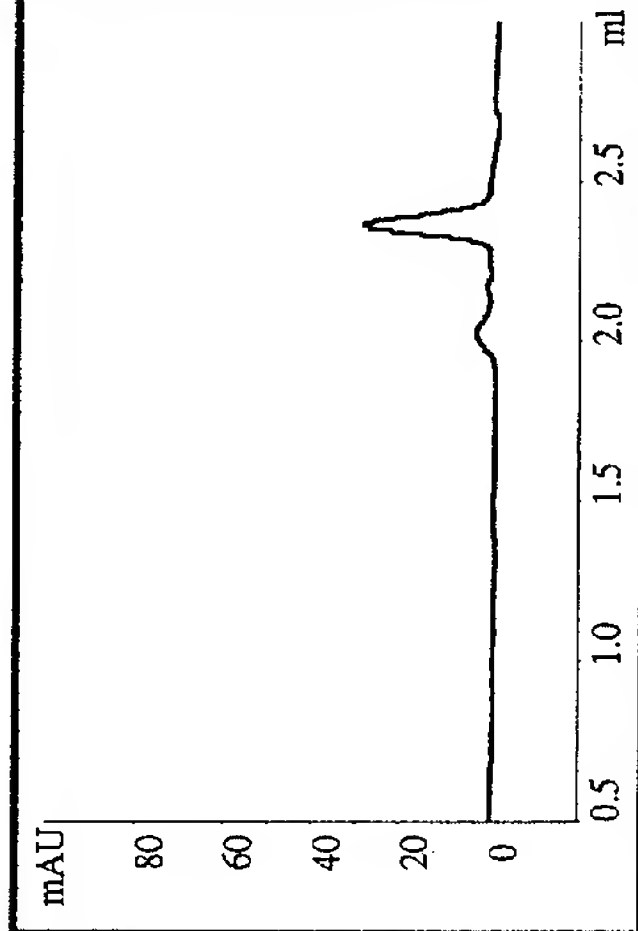
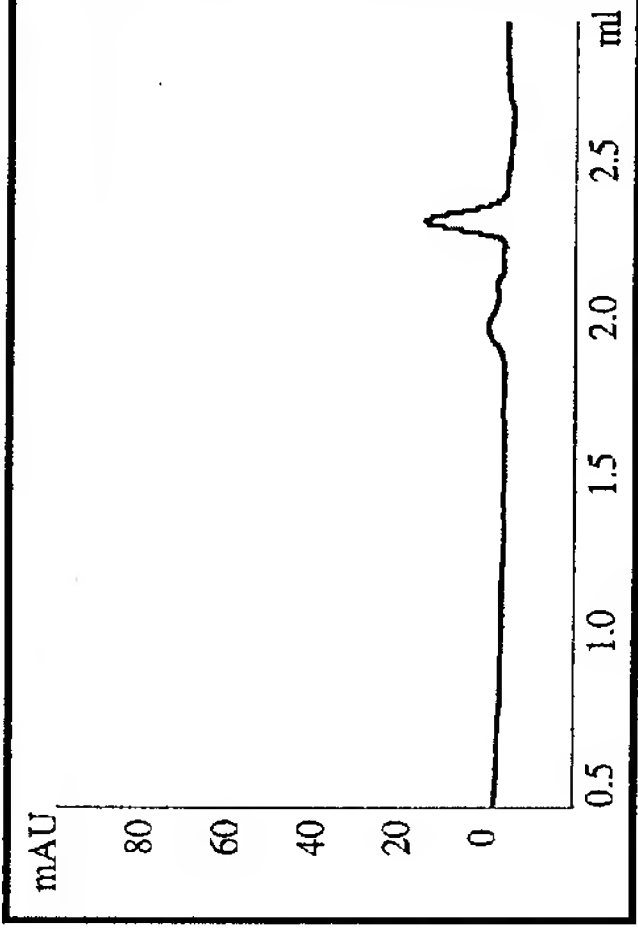
15th day

24th day

PBS

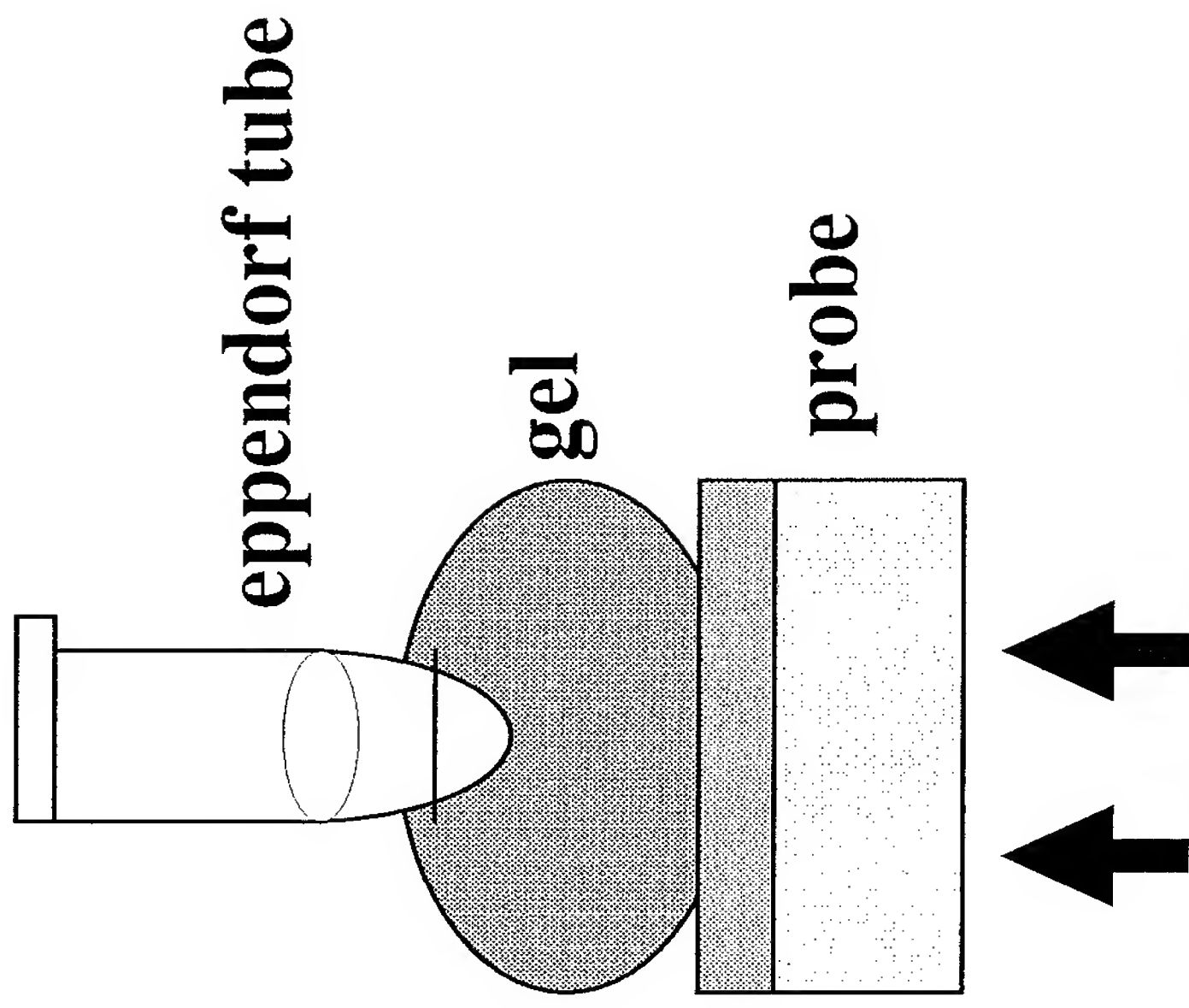
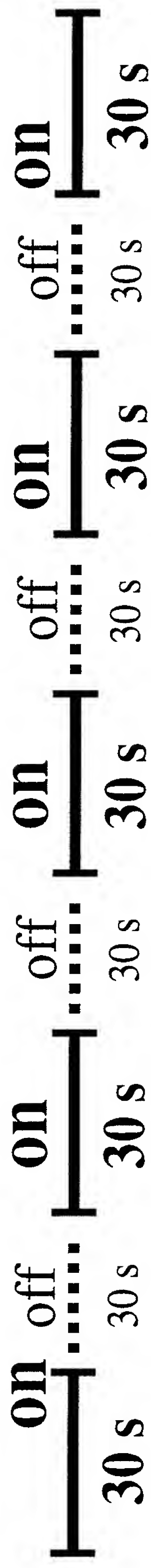


Aβ40



**A**

Figure 3

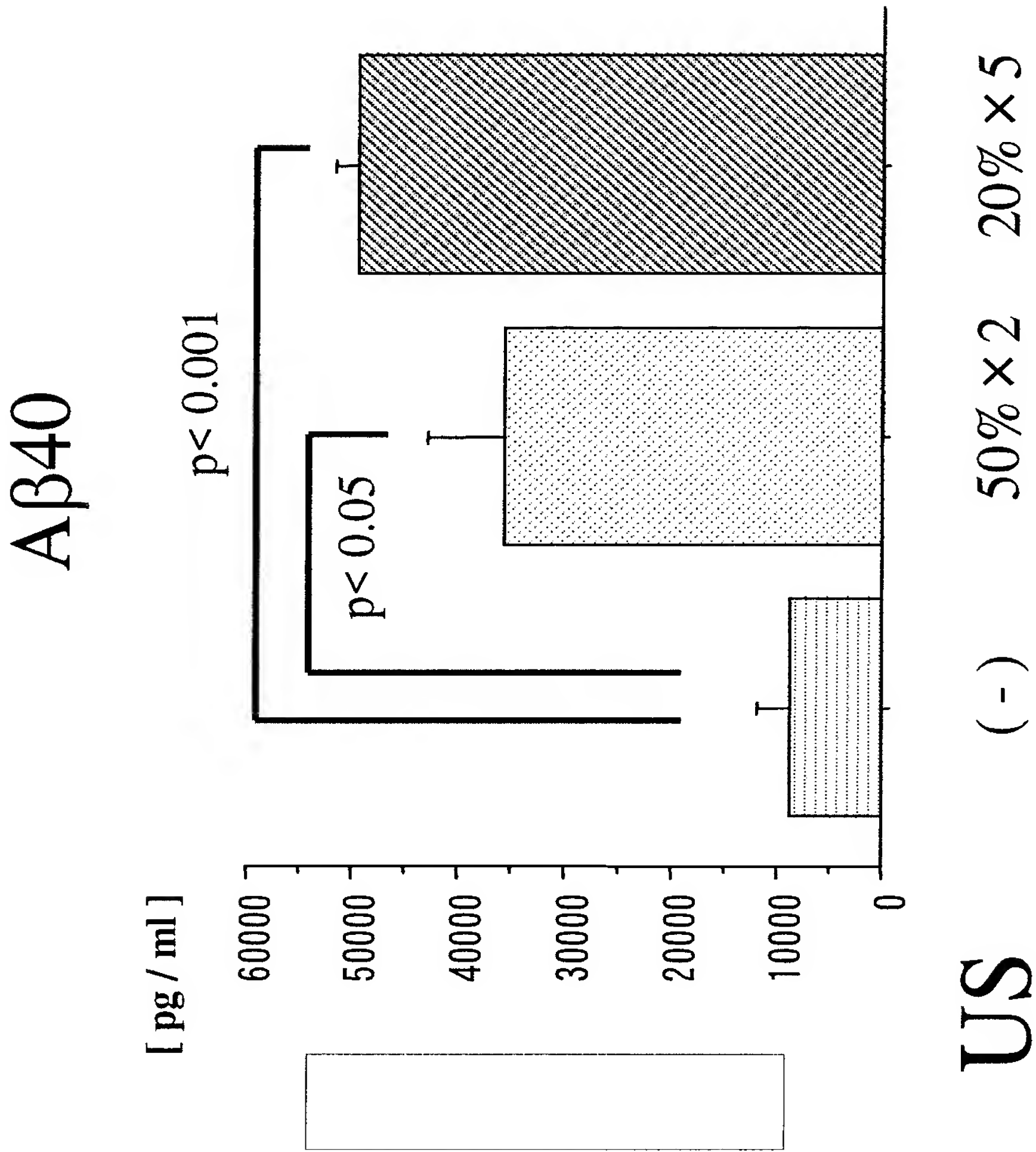


1 MHz, 2W/cm<sup>2</sup>, duty ratio 20 %, 30 sec × 5



B

Figure 4



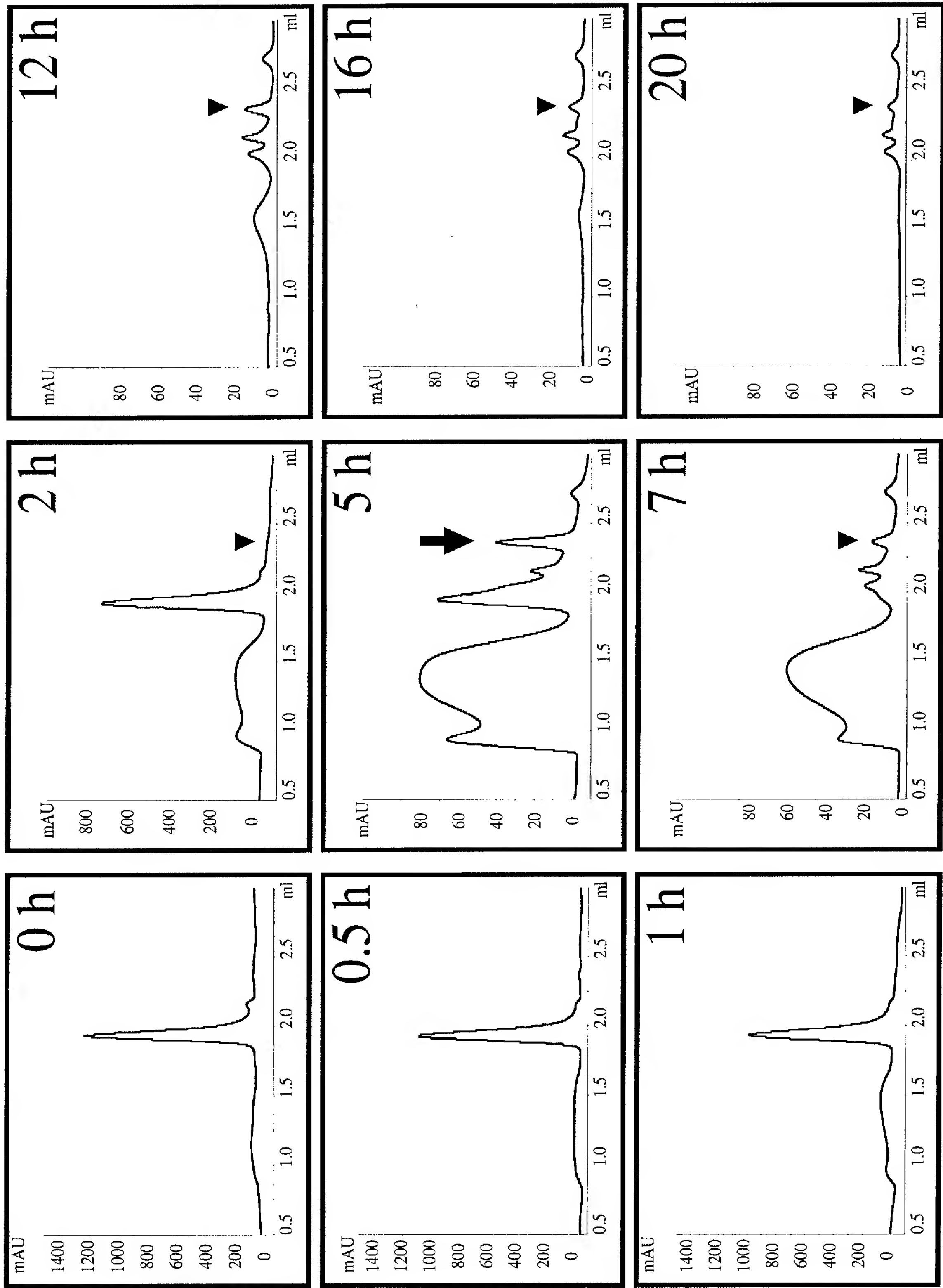
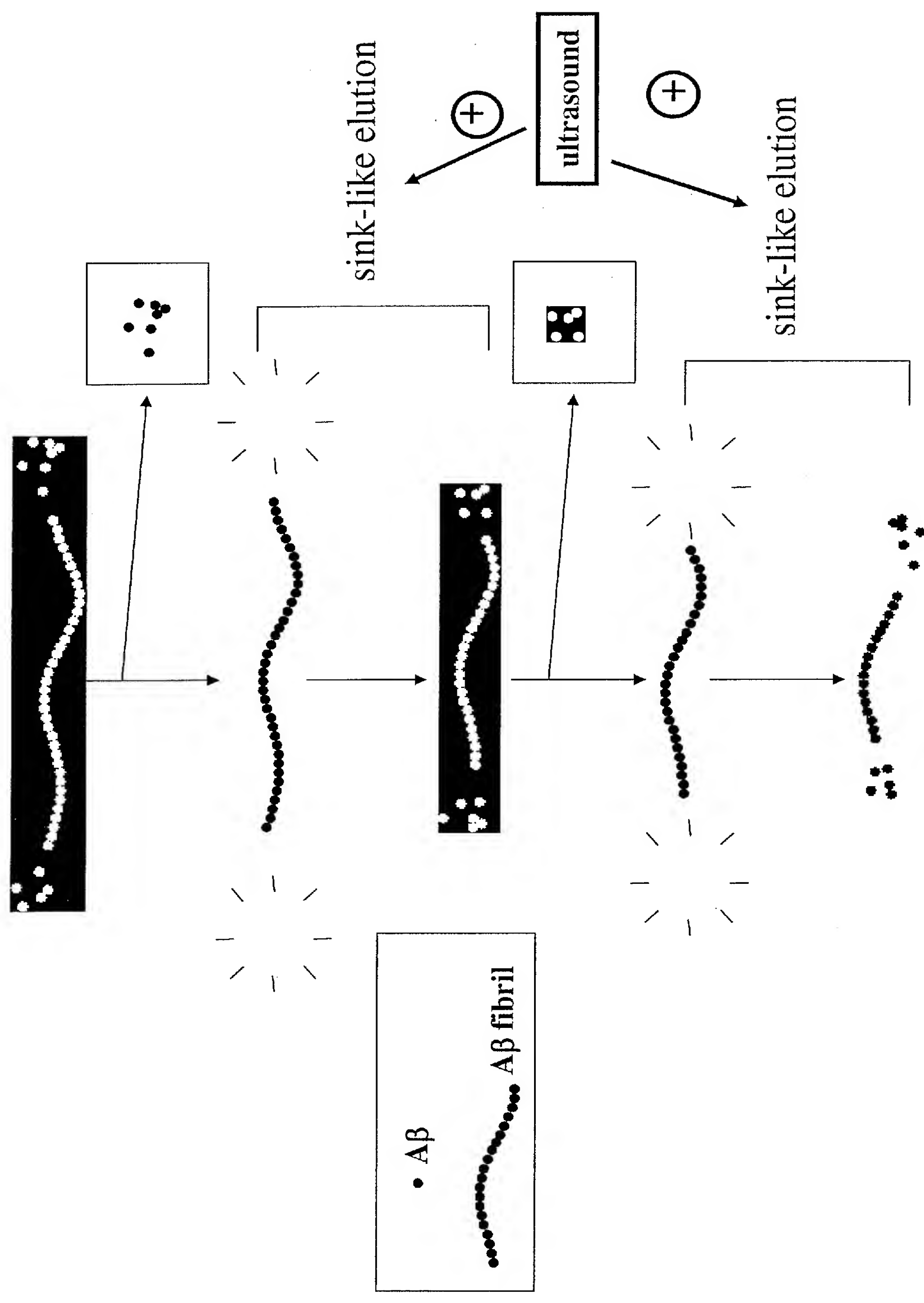


Figure 5

*in vitro* A $\beta$  sink-like elution assay



【書類名】 外国語要約書

1. Abstract

A compound that enhance  $A\beta$  elution in this in vitro  $A\beta$  sink-like elution assay and/or ultrasound may a possible therapeutic option for Alzheimer's disease.

2. Representative Drawings

None.

【書類名】	翻訳文提出書
【あて先】	特許庁長官殿
【出願の表示】	
【出願番号】	特願2004-107746
【特許出願人】	
【識別番号】	500409323
【氏名又は名称】	アンジェスMG株式会社
【代表者】	山田 英
【確認事項】	本書に添付した翻訳文は、特願2004-107746の正確な日本語への翻訳文であり、当該特許出願に記載されていない事項が本書に添付した翻訳文に記載されている場合には、当該出願が拒絶又は無効となる可能性があることを承知していることを申し述べる。
【提出物件の目録】	
【物件名】	外国語特許請求の範囲の翻訳文 1
【物件名】	外国語明細書の翻訳文 1
【物件名】	外国語図面の翻訳文 1
【物件名】	外国語要約書の翻訳文 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

被験化合物の存在下、平衡状態にある可溶性ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの溶媒中濃度を測定することにより、細線維 (fibril) または凝集物 (aggregate) からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去することのできる薬剤候補を同定する方法。

【請求項 2】

薬剤候補が、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの凝集に起因する疾患の治療に用いられるものである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

疾患がアルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、ハンチントン舞踏病またはプリオン病から選ばれた疾患である、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

細線維または凝集物がインビトロで形成されたものである、請求項 1 ないし 3 いずれか記載の方法。

【請求項 5】

平衡状態が超音波照射下にもたらされたものである、請求項 1 ないし 4 いずれか記載の方法。

【請求項 6】

超音波照射が実質的に熱発生を伴わないものである、請求項 1 ないし 5 いずれか記載の方法。

【請求項 7】

超音波照射条件が、1MHz、 $2\text{W}/\text{cm}^2$ 、デューティ比 20%、30秒照射に続き10秒休止の5回反復である、請求項 1 ないし 6 いずれか記載の方法。

【請求項 8】

被験化合物の存在下、平衡状態にある可溶性  $\beta$ -アミロイド ( $A\beta$ ) の溶媒中濃度を測定することにより、インビトロで凝集した細線維または凝集物から  $\beta$ -アミロイド ( $A\beta$ ) を除去することのできる薬剤候補を同定する方法。

【請求項 9】

細線維または凝集物が  $A\beta$  (1-40) からなる、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

細線維または凝集物が  $A\beta$  (1-42) からなる、請求項 8 記載の方法。

【請求項 11】

平衡状態が超音波照射下にもたらされたものである、請求項 8 ないし 10 いずれか記載の方法。

【請求項 12】

超音波照射が実質的に熱発生を伴わないものである、請求項 8 ないし 11 いずれか記載の方法。

【請求項 13】

超音波照射条件が、1MHz、 $2\text{W}/\text{cm}^2$ 、デューティ比 20%、30秒照射に続き10秒休止の5回反復である、請求項 8 ないし 12 いずれか記載の方法。

【請求項 14】

患者に超音波照射することからなる、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの凝集に起因する疾患の治療方法。

【請求項 15】

疾患がアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病またはプリオン病から選ばれた疾患である、請求項 14 記載の方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 薬剤候補を同定するためのアッセイ法

【背景技術】

【0001】

A $\beta$ を含む老人斑は、アルツハイマー病の病理像の一つである。

A $\beta$ の低下は主要な治療対象だと思われる。

【0002】

抗A $\beta$ 抗体による免疫化後のアミロイド除去が報告されている。

最近のデータは、抗体がA $\beta$ の末梢溶出(sink)として働き、末梢／脳の動力学を変化させているかもしれないことを示している。

老人斑が消失したという事実は、A $\beta$ 凝集過程が可逆的であることを意味している。

しかしながら今なお、可溶性A $\beta$ が凝集A $\beta$ から溶出した証拠は存在しない。

【発明の開示】

【0003】

ここで本発明者らは、インビトロで細線維の遠心分離に続く上清への移行(replace)を分析する類似溶出(sink-like)A $\beta$ アッセイを開発したものであり、可溶性A $\beta$ が凝集A $\beta$ から溶出したことのみならず、超音波がA $\beta$ 溶出を促進したことを示すものである。

このインビトロ類似溶出(sink-like)A $\beta$ アッセイにおいてA $\beta$ 溶出を促進する化合物あるいは超音波は、アルツハイマー病治療の可能性ある選択肢になり得るかもしれない。

【0004】

アルツハイマー病(AD)は、脳における老人斑の存在によって特徴付けられる、神経変性疾患である。

40-42アミノ酸からなるペプチドのA $\beta$ は、老人斑の主成分である。

この疾患の遺伝性型は、アミロイド前駆タンパク(APP)およびプレセニリン(presenilin)遺伝子の変異に関連している。

【0005】

これらの遺伝子における疾患に関連する変異は、老人斑において優勢に存在するA $\beta$ 42産生の増加をもたらす。

最近、変異APP遺伝子導入マウスへのA $\beta$ による免疫付与が、プラーク沈着の抑制に効果的であることが示された。(Schenk, Barbour et al. 1999)

さらに、A $\beta$ 抗体の単回投与後、プラークおよび神経病変の双方が可逆的であった。(Lombardo, Stern et al. 2003)

【0006】

A $\beta$ 抗体に加え、A $\beta$ (gelsolinまたはGM1)に高い親和性を有する薬剤による末梢治療は、脳内におけるA $\beta$ レベルを低下させた。(Matsuoka, Saito et al. 2003)

抗体投与による末梢での溶出(sink)メカニズムの発現は、細胞外スペースへの異常タンパク蓄積により特徴付けられる多数の疾患の治療に有用であることが提案されている。(DeMattos, Bales et al. 2001)

インビトロでの、A $\beta$ 凝集過程については十分に研究されている。

【0007】

しかしながら、凝集A $\beta$ からA $\beta$ が溶出する反対の現象は、まだ研究されていなかった。本研究においては、凝集A $\beta$ からのA $\beta$ 溶出について検討するため、我々は新規なインビトロ類似溶出(sink-like)A $\beta$ アッセイを開発した。

ここで、我々は可溶性A $\beta$ が凝集A $\beta$ から溶出したことを示すものである。

【0008】

さらに、超音波はA $\beta$ 溶出を促進した。

このインビトロ類似溶出(sink-like)A $\beta$ アッセイにおいてA $\beta$ 溶出を促進した化合物および／または超音波は、アルツハイマー病治療の選択肢となり得るかもしれない。

【0009】

【特許文献1】 W094/10569号公報



【特許文献2】 W000/26238号公報

【特許文献3】 W000/43791号公報

【0010】

W094/10569公報(特表平8-502587)には、患者において $\beta$ -アミロイド・ペプチド( $\beta$ AP)一関連症状を診断又はモニタリングする方法であって：患者サンプル中の可溶性 $\beta$ AP又は $\beta$ AP断片の量を測定し；

その測定値を所定量の $\beta$ AP又は $\beta$ AP断片と比較し；そして 測定された $\beta$ AP又は $\beta$ AP断片の量と所定の $\beta$ AP又は $\beta$ AP断片の量との間の差異に基づき患者の状態を評価する、ことを含んで成る方法が開示されている。(請求項23)

【0011】

W000/26238公報(特表2002-531065)には、プリオンタンパク質のサンプルを提供し、試験試薬の存在下および不存在下で質的若しくは量的に $\beta$ 形態の量を比較することを含む、 $\beta$ 形態へのプリオンタンパク質の変換を予防、減少及び／または可逆化可能である試薬の同定方法が開示されている。(請求項50)

【0012】

W000/43791(特表2002-540383)公報には、神経変性疾病凝集体形成または原繊維形成種を結合可能な種および神経変性疾病凝集体または原繊維形成を阻害する候補薬剤のための神経変性疾病凝集体または原繊維形成種を含むと考えられる1個のサンプルを含む溶液を作成することと、成分を前記溶液に移したり、容器から溶液を取り出したりせずに、神経変性疾病に特徴的な溶液中の凝集体を検出することより成る方法を開示している。(請求項172)

【0013】

しかしながらこれらの先行技術は、多数のテスト化合物を評価するには、容易でない、迅速でない、信頼性が高くない、あるいは安価でない方法であった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

以下の実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、これらには限定されない。

【実施例1】

【0015】

(1) 方法

1) 薬品および溶媒

特に明示がない限り、薬品はシグマあるいは和光から入手した。

水は二回蒸留し、Milli-Qシステム(ミリポア社、ベッドフォード、マサチューセッツ州)を用いて脱イオン化した。

【0016】

ペプチド

A $\beta$  (1-40)およびA $\beta$  (1-42)はペプチド研究所(大阪、日本)から入手した。

A $\beta$  溶液は実験毎に、記載のようにして新しく調製した。(Hartley, Walsh et al. 1999)

A $\beta$  (1-40) ペプチド 0.55mgを、0.01%フェノールレッドを含む1 mM NaOH 130  $\mu$ lに溶解した。

【0017】

pH 7.5に調整するため、10mM NaOHを加えた。

500  $\mu$  M A $\beta$  溶液を得るため、PBS/ddH<sub>2</sub>Oを加えた。

溶解しなかったA $\beta$ を取り除くため、上清を分取する前に遠心分離した。(15,000 $\times$ g, 3分間)

【0018】

2) サンプル調製

500  $\mu$  M A $\beta$  溶液 20  $\mu$  lを、1.5mlエッペンドルフ管に分取した。

サンプルは細線維化が完了するまで、37℃にて何通りかの時間 インキュベートした。

22℃で遠心分離した後(15,000×g, 10分間)、上清を除いた。

【0019】

得られたペレット(すなわちAβ細線維)をリン酸緩衝液(PBS)で3回洗浄した。

そのペレットに、新しいPBS 20μlを徐々に注意深く加えた。

このサンプルを、37℃にて1日間インキュベートした。

【0020】

22℃において遠心分離した後(15,000×g, 10分間)、上清16μlを採取し分析に供した。

残りの上清は取り除いた。

そのペレットに、新しいPBS 20μlを徐々に注意深く加えた。

【0021】

これらの操作を繰り返した。(図1参照)

サンプルを、下記のようにして、ELISA、ウェスタンブロット法、質量分析、サイズ排除クロマトグラフィ(SEC)により分析した。

【0022】

3) サンドイッチ法 Aβ ELISA

Aβ(1-40)およびAβ(1-42)のためのサンドイッチELISA法は、それぞれAβ(1-40) ELISAキットおよびAβ(1-42) ELISAキット(Biosource)を用いて行った。

【0023】

4) SEC

注入器および紫外検出器からなるHPLCシステムに、Superose 6カラム(Amersham)を取り付けた。

カラムから0.04ml/分にて溶出させ、ペプチドは218nmの紫外吸収にて検出した。

【0024】

各実験は少なくとも2回行った。実験の間にプレバックカラムを2N NaOHで洗浄した。

それぞれの検討のため、適切なカラムを少なくともカラム体積の3倍量の溶出緩衝液で平衡化し、次いで5種類の分子量標準品: トリ・オブアルブミン(44,000); ウマ・ミオグロビン(17,000); ヒトγ-グロブリン(158,000); ウシ・サイログロブリン(670,000); およびビタミンB<sub>12</sub>(1,350)を用いて校正した。

溶出緩衝液として、75mM NaCl、5mM Tris-HCl(pH 7.4)を用いた。

【0025】

5) ゲル電気泳動およびウェスタンブロット法

Tris/Tricineゲル(Invitrogen)を用い、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った。

サンプルを、2×SDS サンプル緩衝液(Invitrogen)と混合し、電気泳動に先立ち5分間急速沸騰させた。

【0026】

サンプルをポリビニリデン・ジフルオリド(PVDF)膜(ミリポア、ベッドフォード、マサチューセッツ、米国)上に移した。

ウェスタンブロット法は、6E10抗体を用いて行った。

ECLを検出システムとして用いた。

【0027】

6) 質量分析

Aβ種の、免疫沈降/マトリックス支援レーザーイオン化-飛行時間型(MALDI-TOF)、複合質量分析計(IP/MS)分析を記載のようにして行った。(Okochi, Steiner et al. 2002)

【0028】

7) 超音波

サンプル管に、室温にて30秒間超音波処理(2.5W/cm<sup>2</sup>)した。(30秒照射の5回繰り返し)

【0029】

(2) 結果

可溶性Aβが凝集Aβから溶出した。

A. 溶出A $\beta$  (1-40)およびA $\beta$  (1-42)のための、サンドイッチELISA法

溶出A $\beta$  (1-40)およびA $\beta$  (1-42)のための、サンドイッチELISA法を記載の実験法により行った。

溶出したA $\beta$  (1-40)量は、 $6562.5 \pm 1750.9$  (S.E.) pg/mlであった。(n=6)

溶出したA $\beta$  (1-42)量は、 $1939.7 \pm 607.6$  (S.E.) pg/mlであった。(n=6)

【0030】

B. 溶出A $\beta$  (1-40)およびA $\beta$  (1-42)質量分析

質量分析にて、溶出したA $\beta$  (1-40)およびA $\beta$  (1-40)の分子量、それぞれ4329.8と4514.0を確認した。

【0031】

D. 溶出A $\beta$  (1-40)およびA $\beta$  (1-42)のSEC分析

SEC分析は、十分な単一の2.4mlピークを示した。

【0032】

超音波はA $\beta$  溶出を促進した。

サンプル管に、室温にて30秒間、デューティー比20%で超音波処理 ( $2.5\text{W}/\text{cm}^2$ ) した。(30秒照射の5回繰り返し)

溶出A $\beta$  (1-40)およびA $\beta$  (1-42)のための、サンドイッチELISA法を行った。

【0033】

30秒間の超音波 ( $2.5\text{W}/\text{cm}^2$ 、デューティー比20%、室温、30秒照射の5回繰り返し)は、A $\beta$  (1-40)溶出を促進した。

(コントロール群:  $8791.7 \pm 3121.1$  (S.E.) pg/ml (n=3); 超音波群:  $49479.3 \pm 2167.6$  (S.E.) pg/ml (n=3); p 0.001未満)

【0034】

もう一つの、デューティー比50%での実験方法(30秒、 $2.5\text{W}/\text{cm}^2$ 、室温、30秒照射の2回繰り返し)もまた、A $\beta$  (1-40)溶出を促進した。

(コントロール群:  $8791.7 \pm 3121.1$  (S.E.) pg/ml (n=3); 超音波群 50% $\times$ 2回:  $35520 \pm 7140$  (S.E.) pg/ml (n=3); p 0.05未満)

【0035】

A $\beta$  (1-42)細線維化およびオリゴマー化の、SEC分析

溶解後直ちに記述の実験方法にて、可溶性A $\beta$  (1-42)を Superose 6 クロマトグラフィー分析した。

ゲルに由来するピーク (gel-included peak)は1.9mlにおいて溶出した。

【0036】

このピーク中のA $\beta$ オリゴマー・サイズを決定することはできなかった。

細線維前駆体のオリゴマーは、1時間から12時間の間に観察された。

2.4mのピークは5h時に上昇した。

このピークは、SECにおいてA $\beta$  (1-40)溶出が分析された時観察されたので、同じフラクションに溶出した。

【0037】

文献

1. DeMattos, R. B., K. R. Bales, et al. (2001).

"Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease."

Proc Natl Acad Sci U S A 98(15): 8850-5.

2. Hartley, D. M., D. M. Walsh, et al. (1999).

"Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons."

J Neurosci 19(20): 8876-84.

3. Lombardo, J. A., E. A. Stern, et al. (2003).

"Amyloid-beta antibody treatment leads to rapid normalization of plaque-induce

d neuritic alterations.”

J Neurosci 23(34): 10879-83.

4. Matsuoka, Y., M. Saito, et al. (2003).

”Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to beta-amyloid.”

J Neurosci 23(1): 29-33.

5. Okochi, M., H. Steiner, et al. (2002).

”Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1.”

Embo J 21(20): 5408-16.

6. Schenk, D., R. Barbour, et al. (1999).

”Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse.”

Nature 400(6740): 173-7.

## 【図面の簡単な説明】

### 【0038】

【図1】 インビトロ類似溶出(sink-like)A $\beta$ アッセイの実験手順を示した図である。

500 $\mu$ M A $\beta$ 溶液 20 $\mu$ lを1.5mlエッペンドルフ管に分取した。37℃にて細線維化が完了するまで、サンプルを何通りかの時間インキュベートした。22℃にて遠心分離後(15,000 $\times$ g, 10分間)、上清を取り除いた。得られたペレット(すなわち A $\beta$ 細線維)をPBSで3回洗浄した。ペレットに、新しいPBS 20 $\mu$ lを徐々に注意深く加えた。サンプルを37℃にて1日間インキュベートした。22℃にて遠心分離後(15,000 $\times$ g, 10分間)、上清16 $\mu$ lを採取し分析に供した。残りの上清を取り除いた。ペレットに、新しいPBS 20 $\mu$ lを徐々に注意深く加えた。この操作を繰り返した。サンプルを、ELISA、ウエスタンブロット法、質量分析、SECにより分析した。

【図2A】 可溶性A $\beta$ が凝集A $\beta$ から溶出したことを示した図である。A. 溶出A $\beta$  (1-40)およびA $\beta$  (1-42)のためのサンドイッチELISA法 溶出A $\beta$  (1-40)およびA $\beta$  (1-42)のためのサンドイッチELISA法は、記載の実験手順により行った。

【図2BC】 B. 溶出A $\beta$  (1-40)およびA $\beta$  (1-42)のための質量分析 C. 溶出A $\beta$  (1-40)のウエスタンブロット法分析

【図2D】 D. 溶出A $\beta$  (1-40)のSEC分析

【図3A】 超音波がA $\beta$ 溶出を促進したことを示した図である。A. 超音波の実験手順

【図3B】 B. 溶出A $\beta$  (1-40)のサンドイッチELISA法

【図4】 A $\beta$  (1-42)の細線維化およびオリゴマー化の、SEC分析を示した図である。

【図5】 インビトロ類似溶出(sink-like)A $\beta$ アッセイを図式的に示した図である。

【配列表】

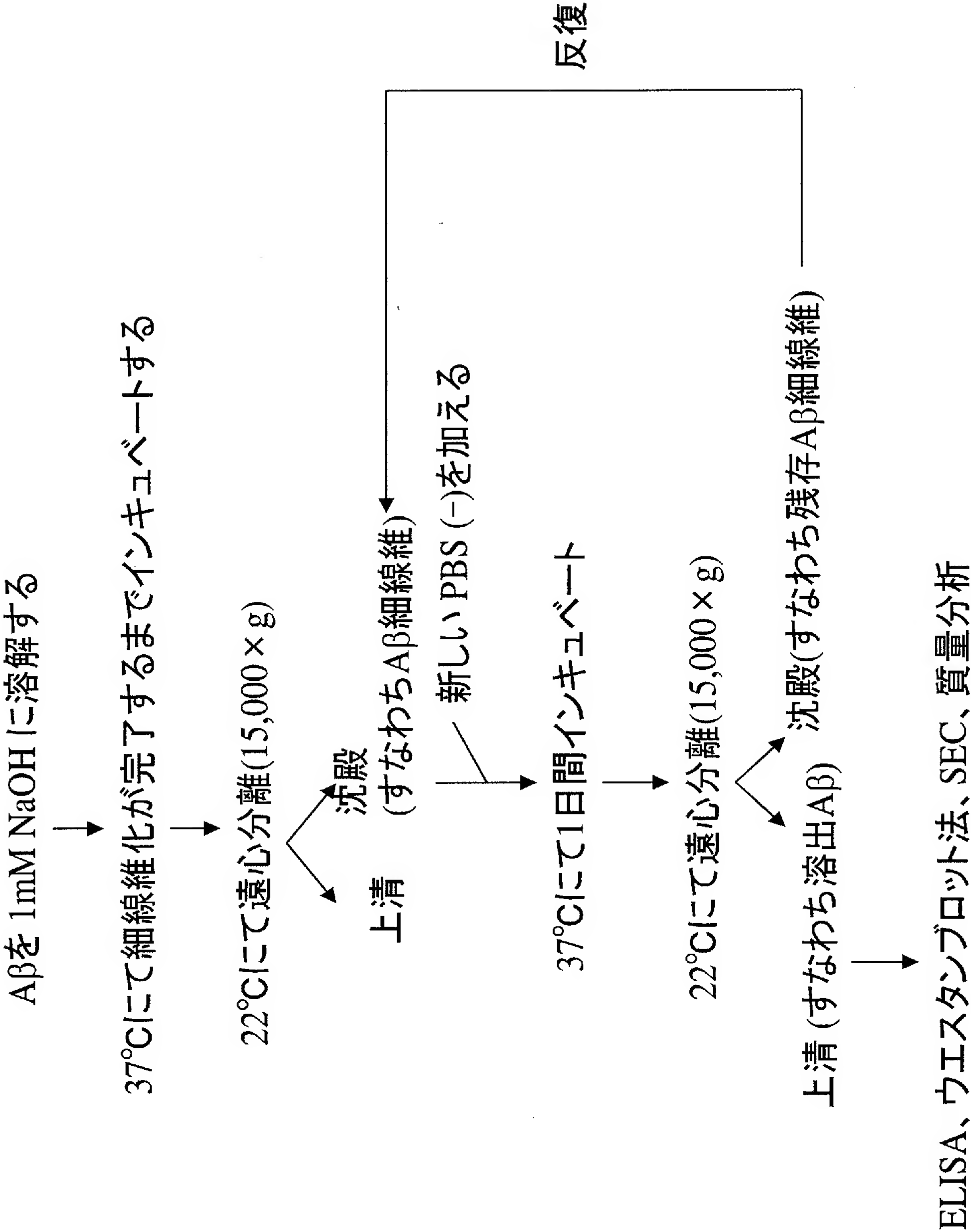
【配列表】

<110> Naoyuki Sato  
<160> NUMBER OF SEQ ID NOS: 2  
<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 40  
<212> Peptide  
<213> Homo Sapiens  
<223> OTHER INFORMATION: A $\beta$ 40  
<400> SEQUENCE: 1  
DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV 40

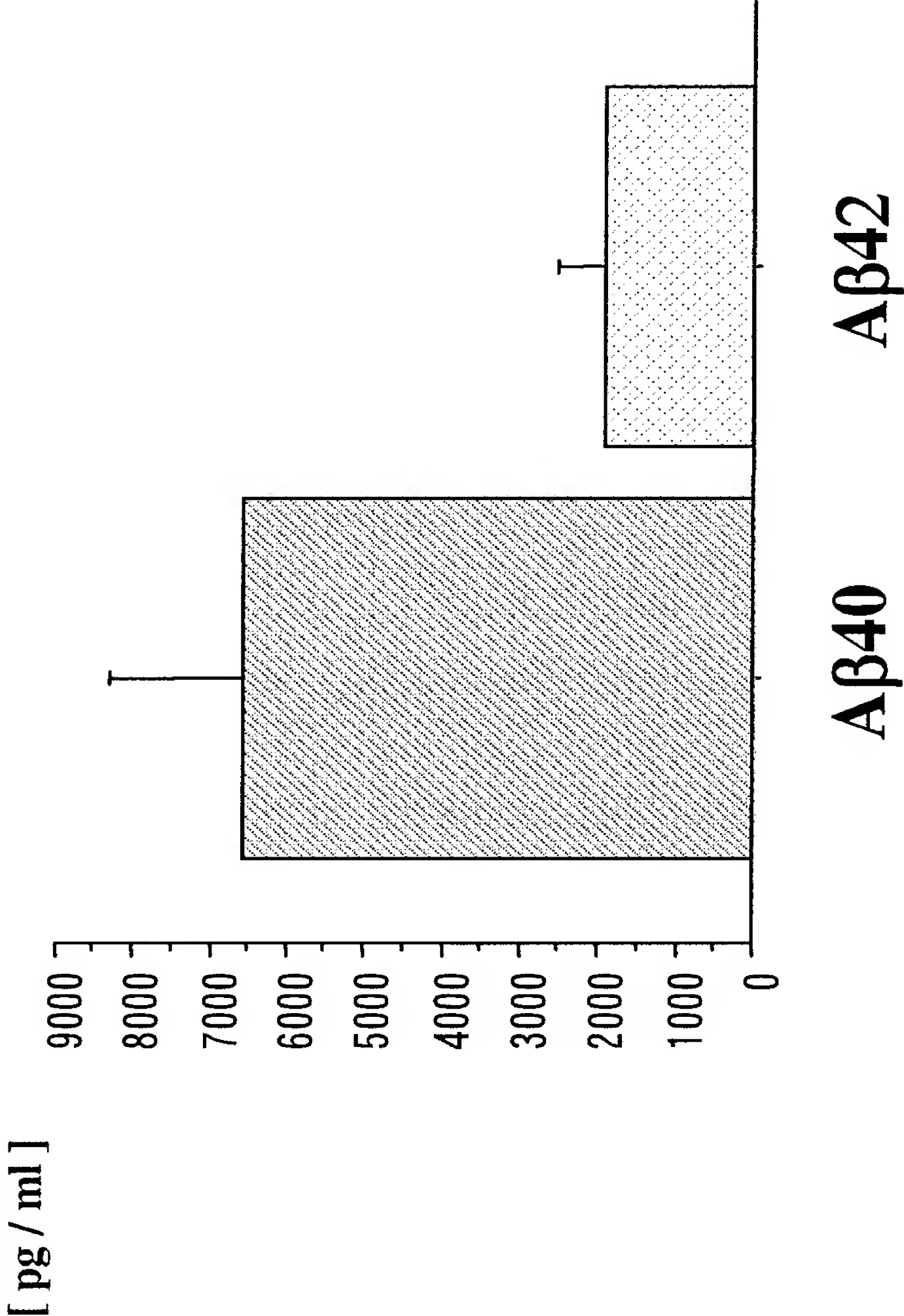
<210> 2  
<211> 42  
<212> Peptide  
<213> Homo Sapiens  
<223> OTHER INFORMATION: A $\beta$ 42  
<400> SEQUENCE: 2  
DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGAIIGLMVGGVVI A 42

インビトロ類似溶出(sink-like) Aβ アッセイ



A

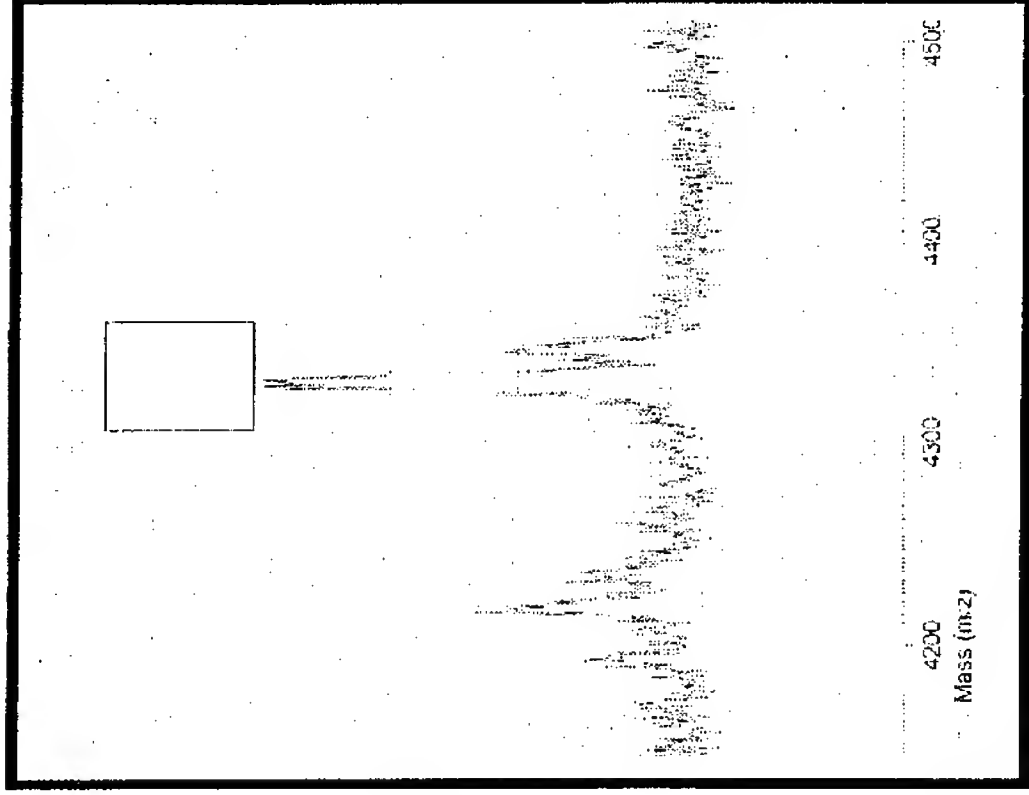
【図 2 A】



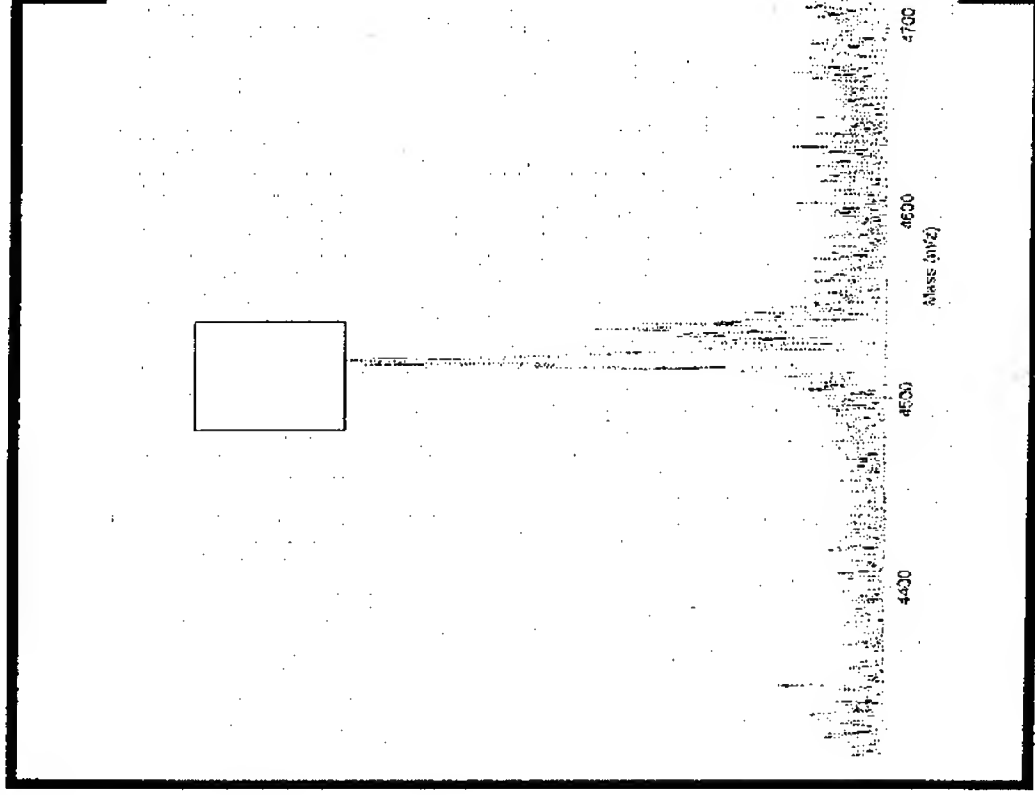


B

Aβ40

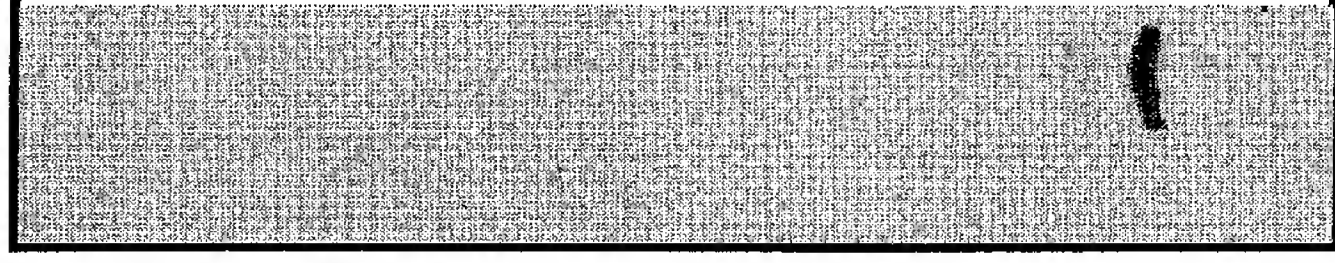


Aβ42



C

PBS  
Aβ40 sup

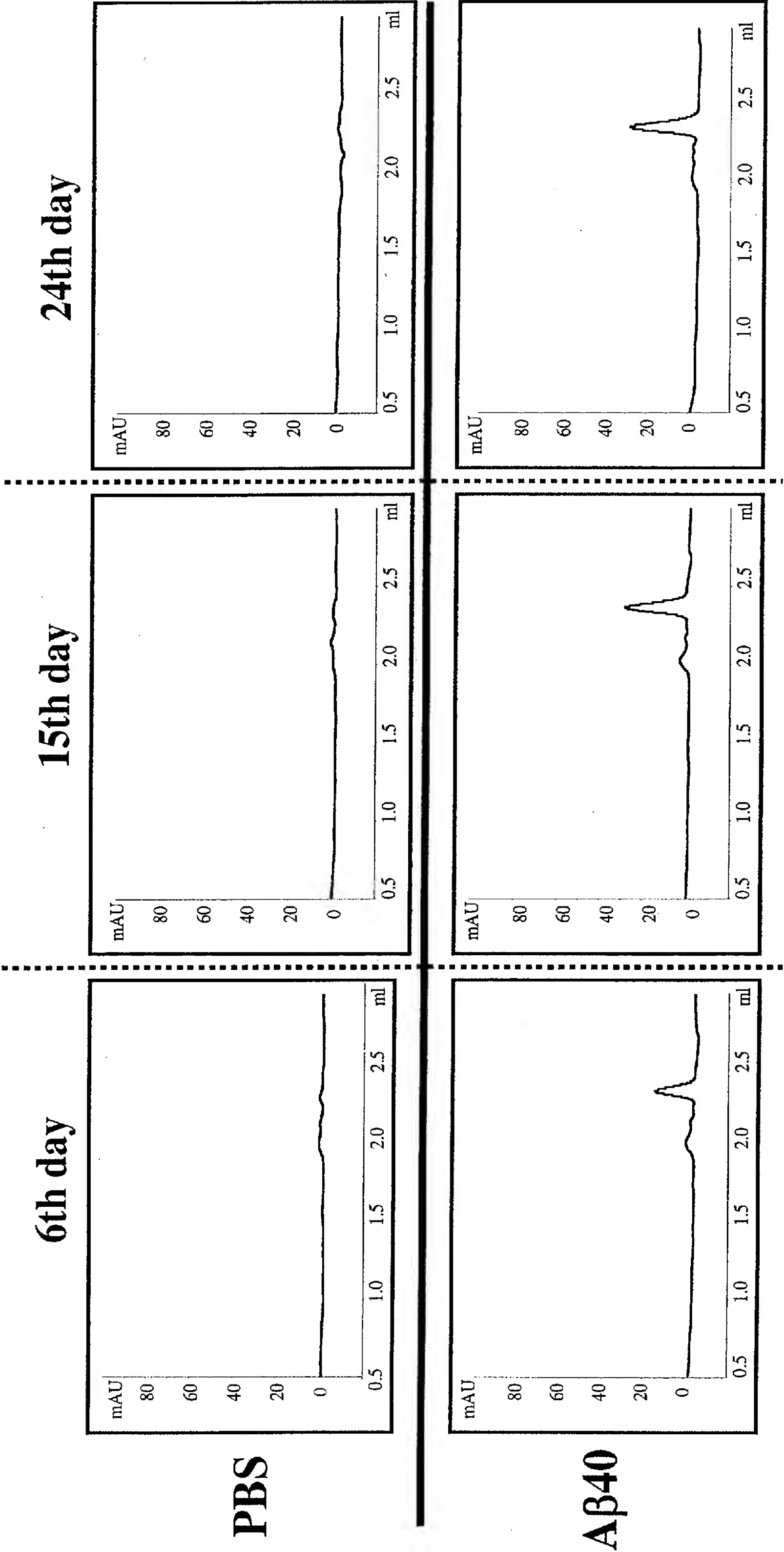


WB : 6E10

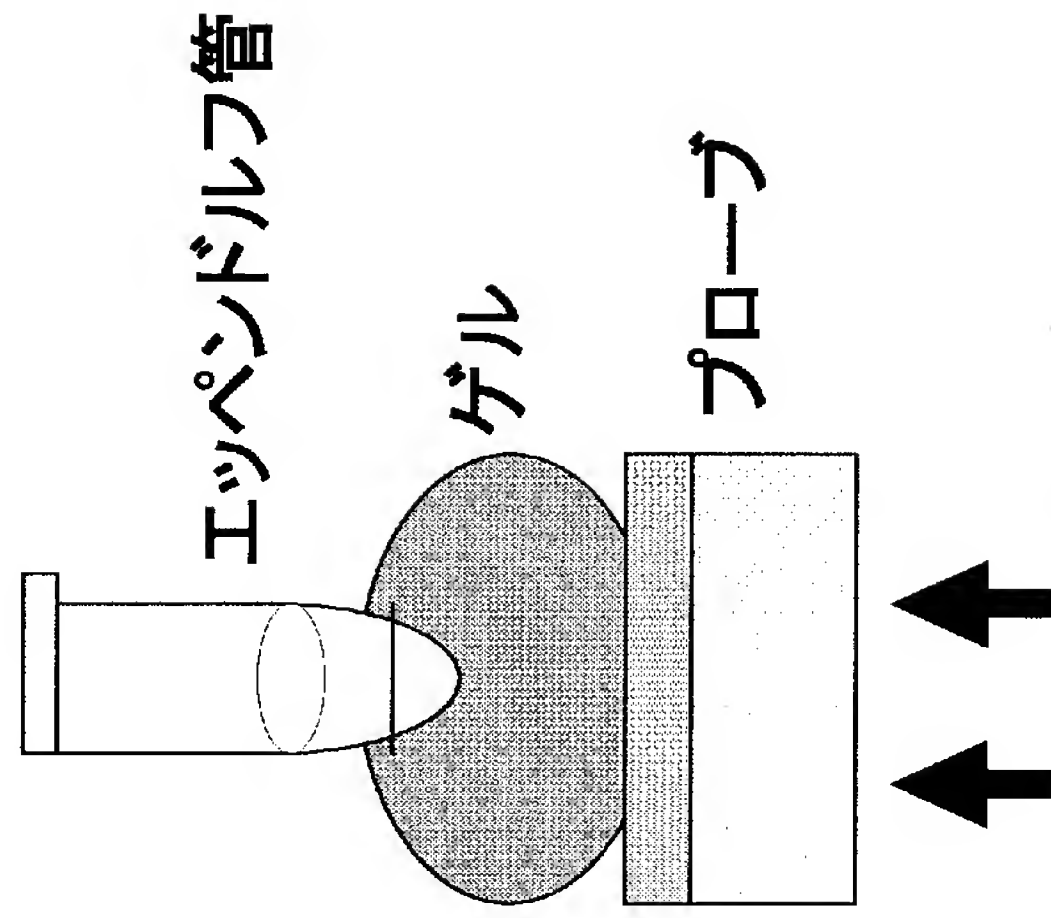
—34.5  
—27.4  
—15.8  
—7.9  
—4

E

【 2 D 】



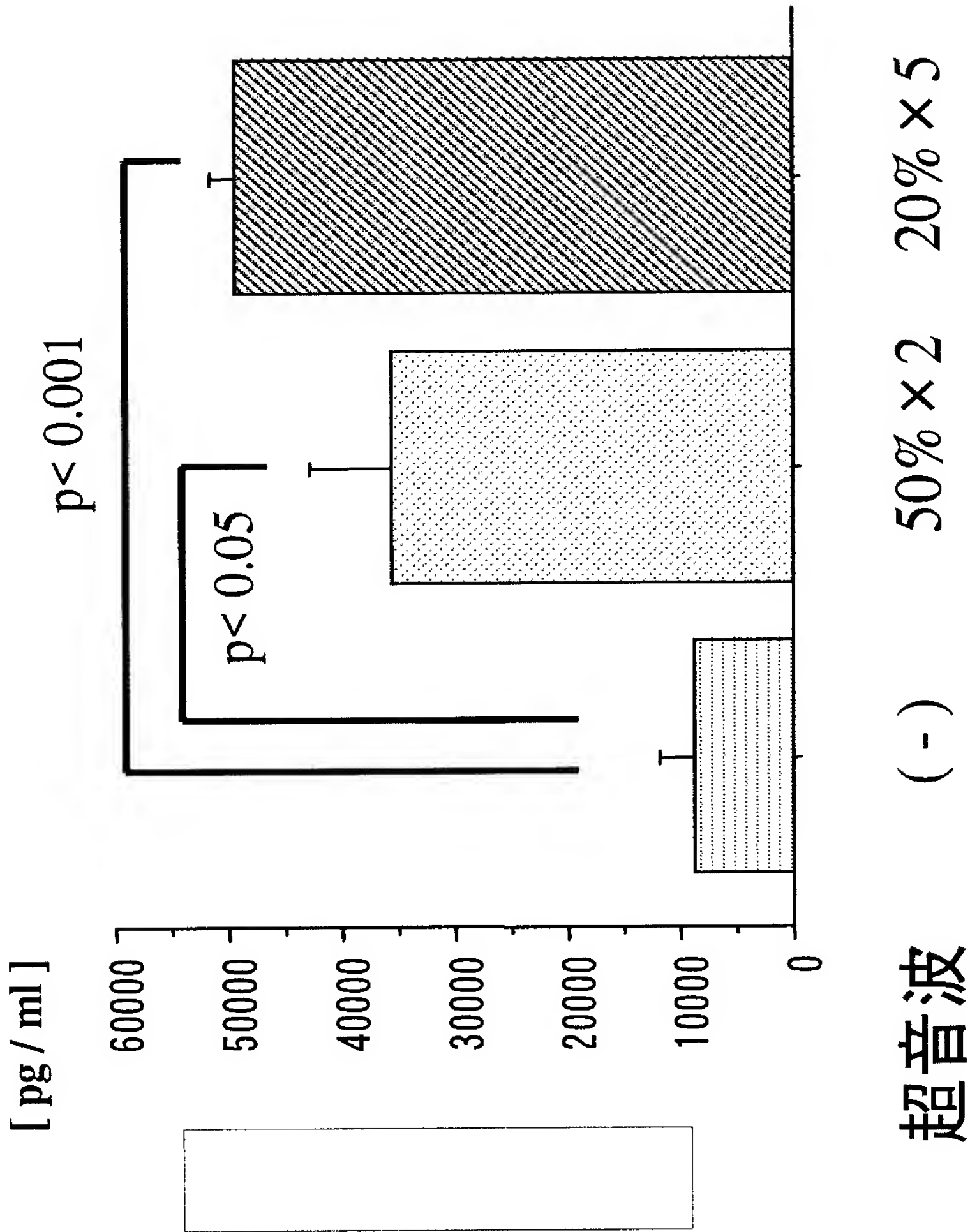
A



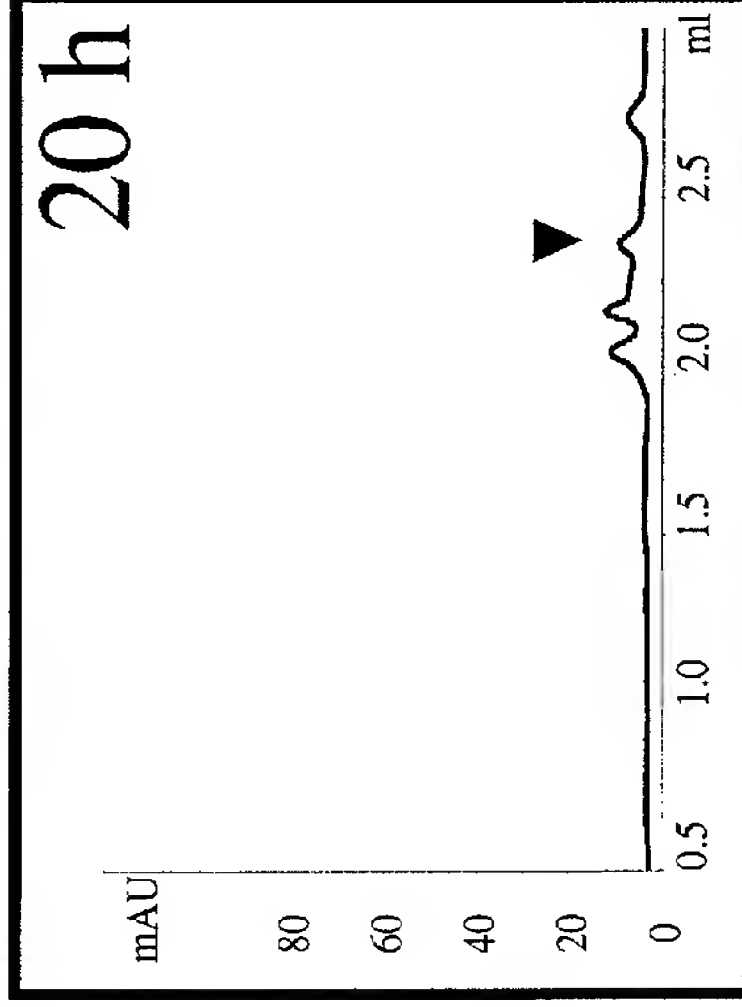
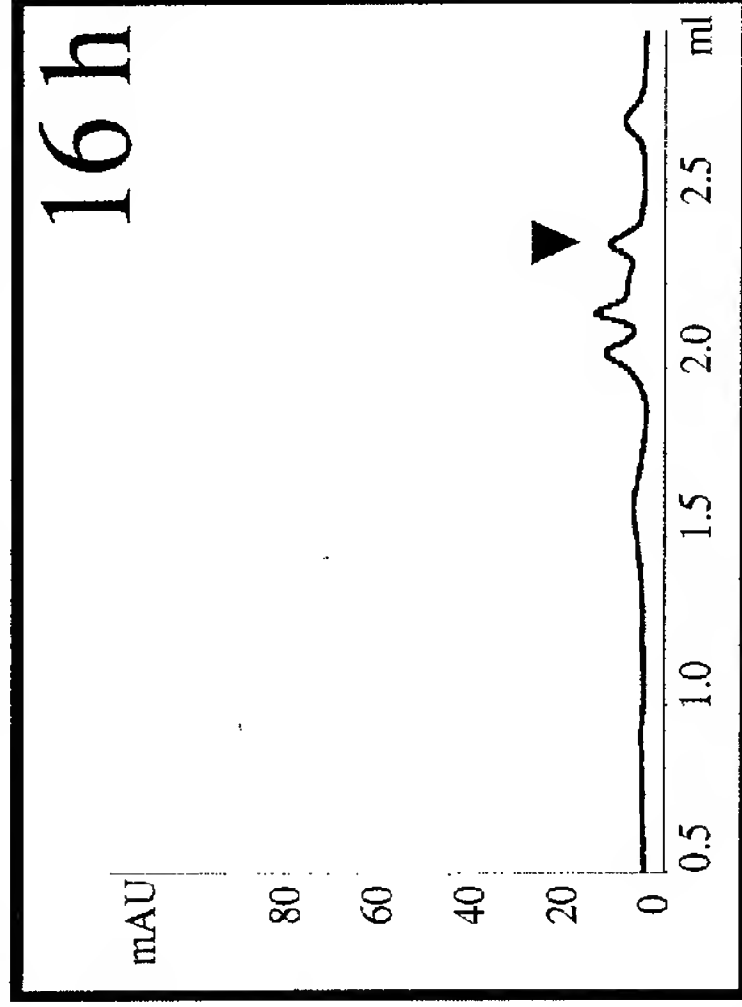
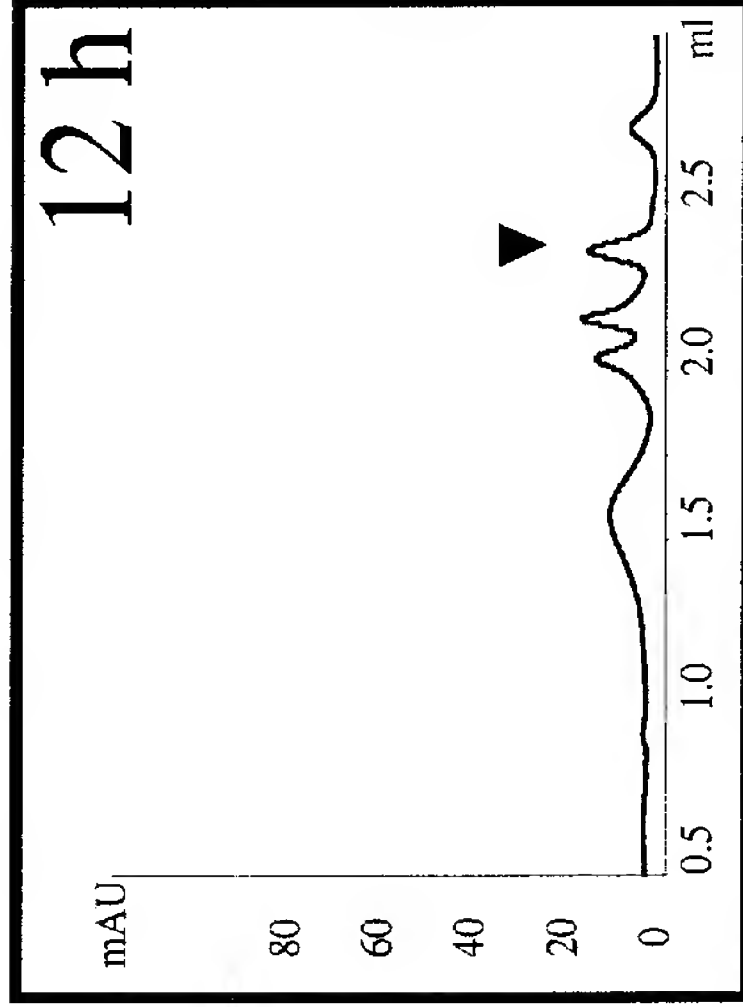
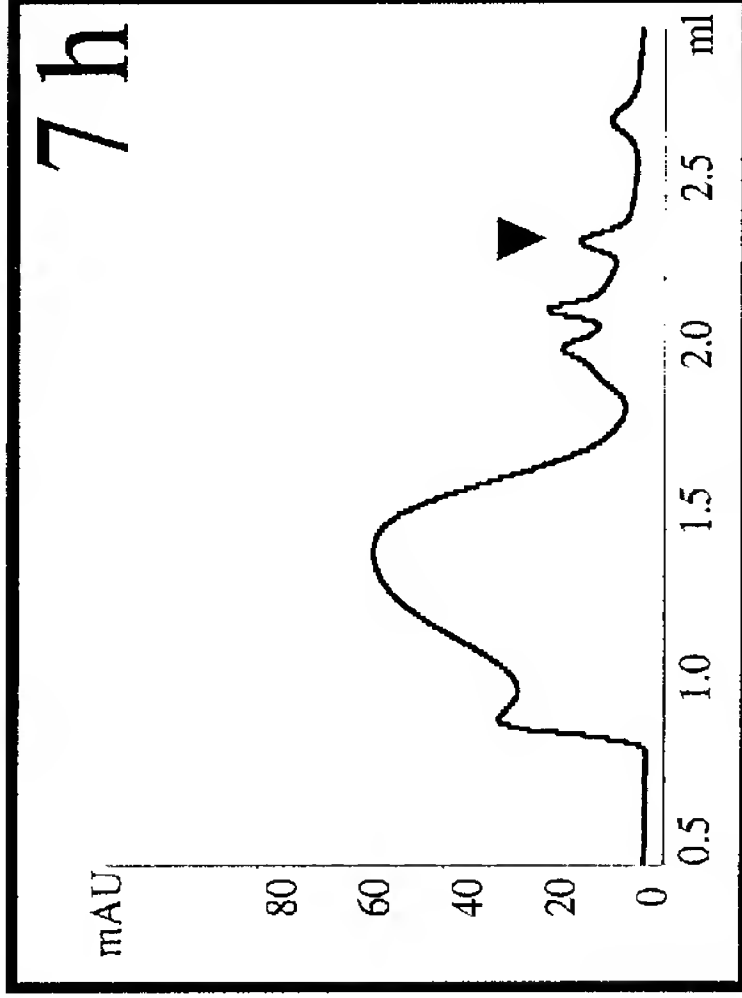
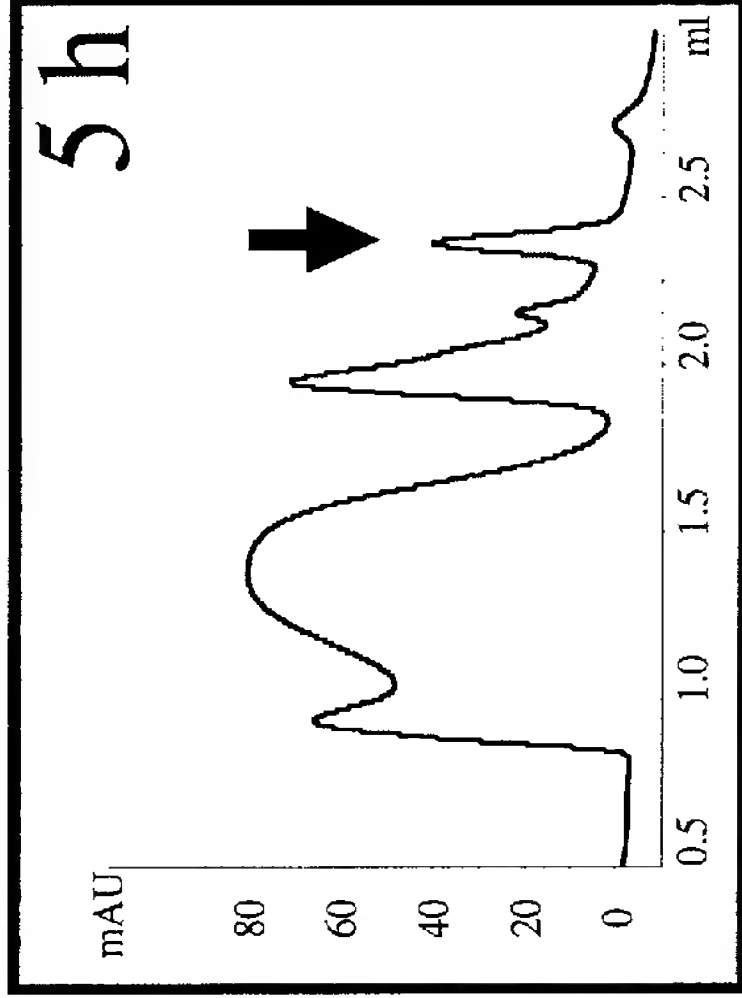
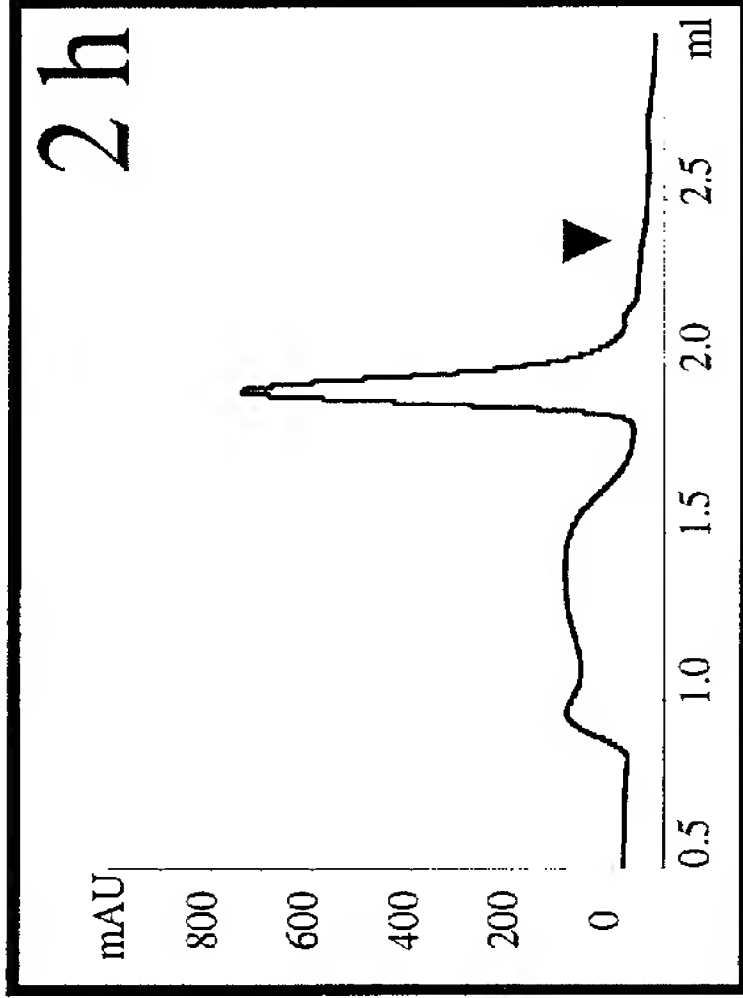
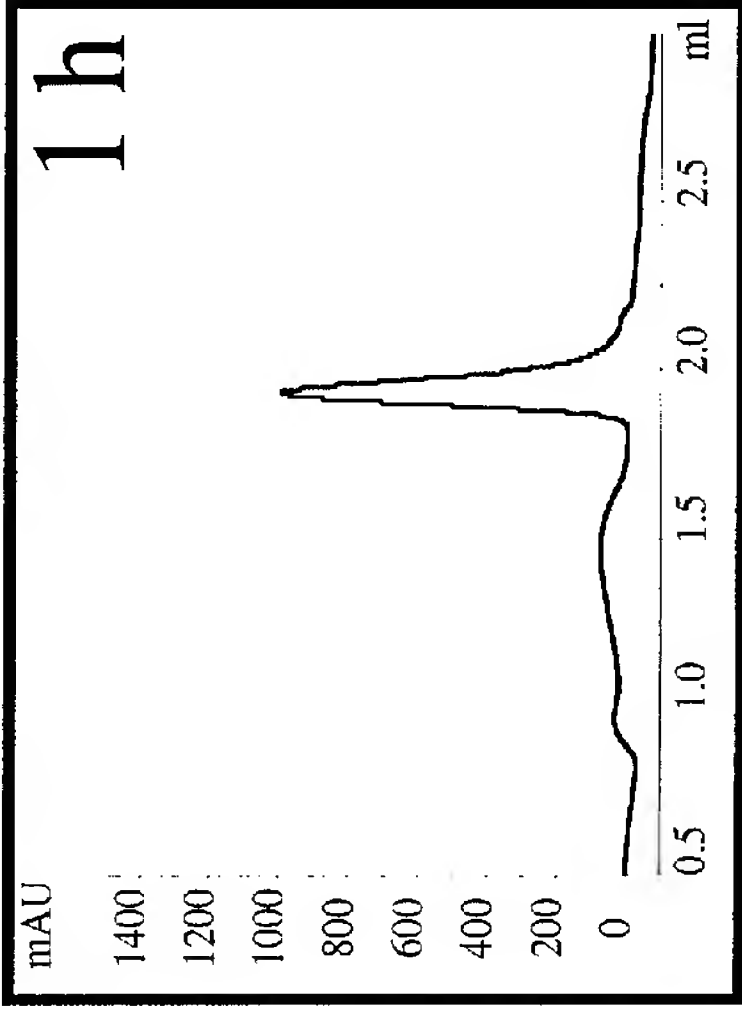
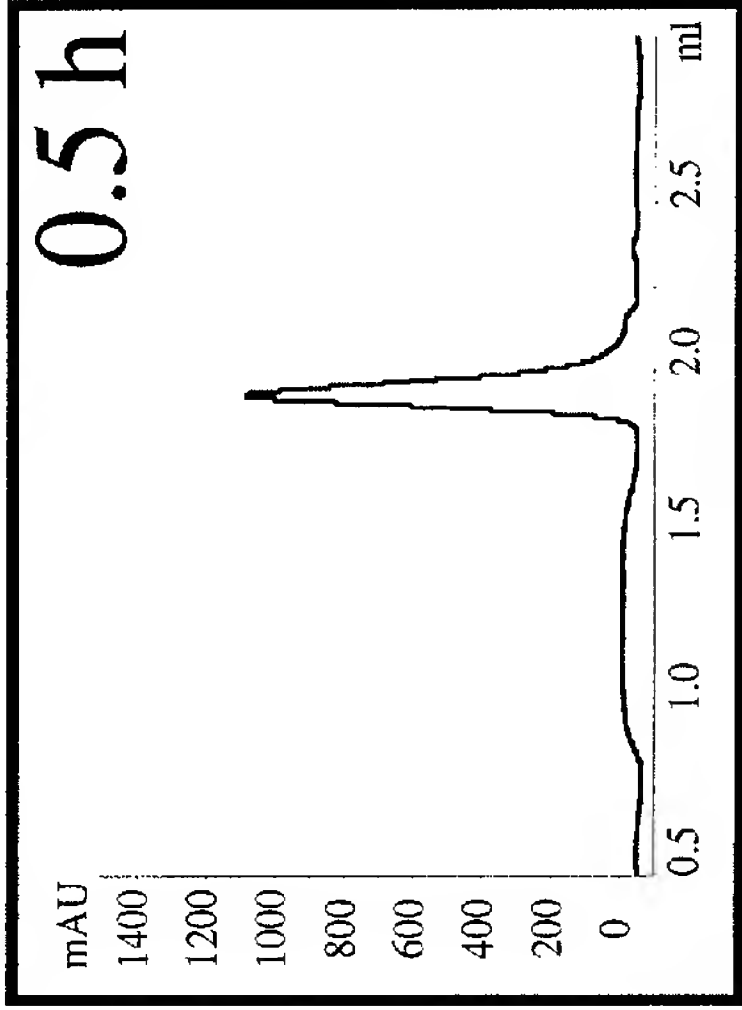
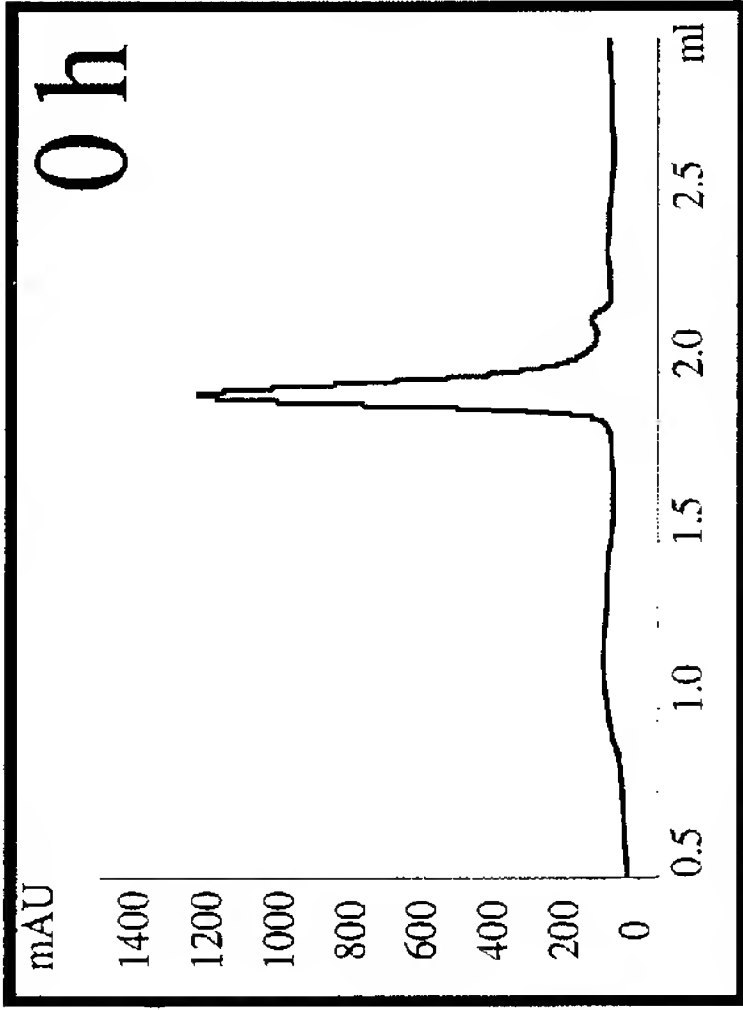
1 MHz, 2W/cm<sup>2</sup>, デューティー比 20 %, 30 秒 × 5

B

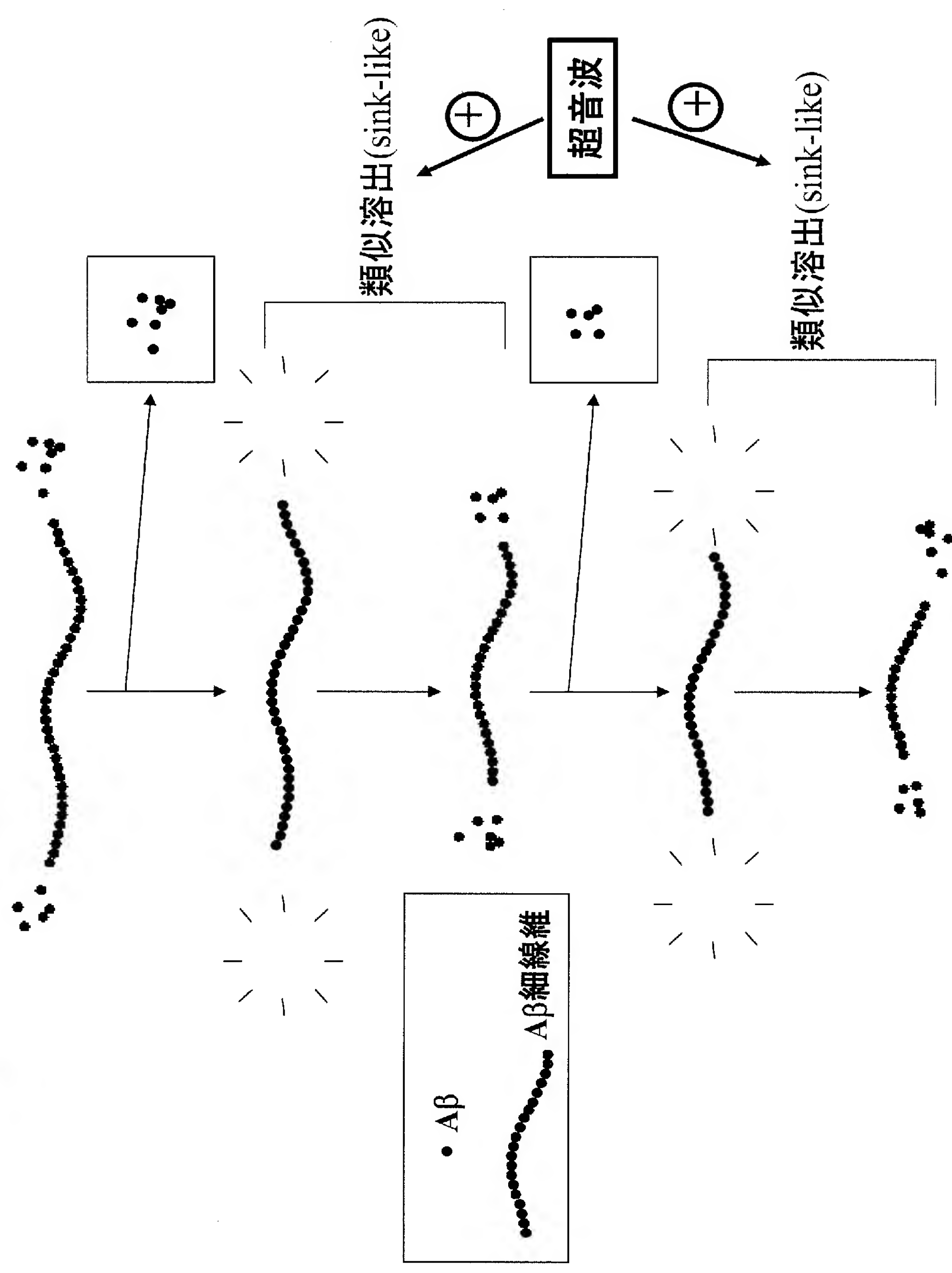
Aβ40



超音波



# インビトロ類似溶出(sink-like) Aβアッセイ



- 【書類名】 要約書
- 【要約】
- 【課題】
- 【解決手段】
- 【選択図】 なし

このインビトロ類似溶出 (sink-like)  $A\beta$  アッセイにおいて  $A\beta$  溶出を促進した化合物および／または超音波は、アルツハイマー病治療の選択肢となり得るかもしれない。



## 出願人履歴

5 0 0 4 0 9 3 2 3

20011206

名称変更

5 0 1 4 4 7 0 0 7

大阪府豊中市新千里東町 1 丁目四番二号

アンジェス エムジー株式会社

5 0 0 4 0 9 3 2 3

20040422

名称変更

5 0 1 4 4 7 0 0 7

大阪府豊中市新千里東町 1 丁目四番二号

アンジェスMG株式会社

5 0 0 4 0 9 3 2 3

20040916

住所変更

5 0 1 4 4 7 0 0 7

大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目 7 番 1 5 号

アンジェスMG株式会社